GE Healthcare

Biacore

Biacore® X100

Plus Package

Instrument Handbook

日本語取扱説明書

GE imagination at work

71-3190-31

目　次

実験を始める前に I

A. Biacore（ビアコア）とは I

B. 実験の流れ I

C. 固定化 II
C-1. アミンカップリング法 IV
C-2. リガンド希釈液の pH 選択 VI

D. 相互作用測定 VII
D-1. 相互作用測定の条件検討 VII
D-2. 反応速度定数・解離定数の求め方 IX
D-3. ビアコアを用いた濃度測定の原理 XII

1. セットアップ 1

1-1. 電源およびソフトウェアの起動 1
1-1-1. 電源の立ち上げ 1
1-1-2. ランニング緩衝液、廃液ボトルのセット 1
1-1-3. ペリスターポンプのセット 2
1-1-4. コントロールソフトウェアの起動 3

1-2. システムの初期化 5
1-2-1. センサーチップの挿入 5
1-2-2. ランニング緩衝液による平衡化 8
1-2-3. 温度設定 9
1-2-4. サンプルのセットとラックの取り出し 10

1-3. 測定モード 11

2. 基本操作（マニュアルモード） 13

2-1. 測定の開始 13
2-1-1. サンプルの添加 16
2-1-2. レポートポイントの追加 20
2-1-3. 測定の終了 22

2-2. ファイルの保存 23

2-3. データの印刷 23

3. 反応速度定数・解離定数の算出 24

3-1. ワークフローの作成 24

3-2. リガンド希釈液の pH 選択の実行 28

3-3. 固定化の実行 34

3-4. 特異的結合の確認および再生条件の検討 44
3-4-1. マニュアル測定による条件検討 44
3-4-2. ウィザード測定による条件検討 53

3-5. マルチサイクル法による測定の実行 62

3-6. シングルサイクル法の実行 65

3-7. データ解析 71
3-7-1. カイネティクス解析 71
3-7-2. 平衡値解析 84

4. 濃度測定 88

4-1. 濃度測定の実行および解析 88

5. 結合の有無の確認、スクリーニング 98

5-1. ワークフローの作成 98

5-2. リガンド希釈液の pH 選択の実行 102

5-3. 固定化の実行 108

5-4. 特異的結合の確認および再生条件の検討 114
5-4-1. マニュアル測定による検討 114
5-4-2. ウィザード測定による検討 123

5-5. 結合の有無の確認、スクリーニングの実行および解析 132

6. メンテナンス 136

6-1. メンテナンスの準備 137

6-2. メンテナンスの実行 138
6-2-1. Desorb 139
6-2-2. Desorb and Sanitize 140

6-3. システムチェックとポンプキャリブレーション 142

7. シャットダウン 144

7-1. 実験の終了 144
7-1-1. Standby 状態での放置 144
7-1-2. 電源を落として終了 144

7-2. センサーチップの保存 148

8. センサーグラムの編集 149

8-1. 解析用ソフトウェアの起動 149

8-2. ファイルの呼び出し 149

8-3. センサーグラムの編集 151
8-3-1. センサーグラムの選択 151
8-3-2. センサーグラムの表示の変更 152
8-3-3. サンプル添加開始時間、ベースライン合わせ 152
8-3-4. センサーグラムの不必要部分の削除 153

8-4. グラフの編集 154

8-5. グラフの貼り付け 156

8-6. データの移管 157

8-7. データの保存 158

9. ユーザー管理 159

9-1. ユーザー管理 159

9-2. データバックアップの設定 162

実験を始める前に

A. Biacore（ビアコア）とは

Biacore は、表面プラズモン共鳴（surface plasmon resonance, SPR）という光学現象を利用して生体分子間の相互作用をラベルなしでリアルタイムにモニターする装置である。
Biacore システムの研究対象は、タンパク質-タンパク質間相互作用に限定されず、脂質-タンパク質、核酸-タンパク質、核酸-核酸、細胞-タンパク質あるいは低分子化合物-タンパク質など様々な分子間相互作用に及ぶ。
使用目的は、それら分子間の特異的結合の検討（スクリーニング）、解離定数の算出、反応速度定数の算出、分子間の特異的結合を利用した濃度測定など、多岐にわたる。

B. 実験の流れ

データを取得するまでの実験の流れは、以下の通りである。
①センサーチップへの分子の固定化
②相互作用測定の条件検討
③各測定系におけるアッセイ（データ取り）
④解析
ここでは、①と②について概説する。③および④については、各章を参照のこと。

C. 固定化

リガンド

相互作用を検討する分子のうち、固定化する分子をリガンドと言う。リガンドの精製度は、結合特異性の判定やアナライトの結合許容量に大きく影響する。90%以上の精製度のリガンドを使用する。

各種固定化方法

センサーチップ CM5 に化学結合で固定化する代表的な方法を記載する。詳細およびその他の固定化方法については、“生体分子相互作用解析　攻略ガイド”を参照。

アミンカップリング法

リガンド表面に存在するアミノ基（N 末端アミノ基またはリジン ε -アミノ基）を利用して固定化する方法。CM（カルボキシメチル）デキストランのカルボキシル基を NHS（N-ヒドロキシスクシンイミド）で活性化し、リガンドを固定化する。固定化後、残った活性 NHS 基をエタノールアミンでブロッキングする。

リガンドチオールカップリング法

リガンドの表面に存在する遊離型チオール基を用いて-S-S-結合で固定化する方法。

サーフェスチオールカップリング法

センサー表面にチオール基を導入し、リガンドのカルボキシル基を介して-S-S-結合で固定化する方法。

アルデヒドカップリング法

大量の糖鎖を持つムチンタンパク質等の糖を利用して固定化をする方法。糖鎖の非還元末端をメタ過ヨウ素酸により開裂させアルデヒド基を作成して、ヒドラジンによりヒドラジノ基を導入したセンサーチップにシッフ塩基で固定化する。

固定化量

実験の目的によって調節する必要がある。

特異的結合の有無の判定、スクリーニング

アナライトの結合レスポンスが十分得られる固定化量が必要となる。固定化量の下限として、理論的最大結合量 Rmax（固定化したリガンドにアナライトが最大量結合したときのレスポンス）が、最低でも 100RU は必要である。理論的な最大結合量は、以下の式で算出することができる。

アナライトの最大結合レスポンス（理論的最大結合量 Rmax）
=アナライトの分子量 x リガンドの固定化量 /リガンドの分子量 x S
（Da）　　（RU）　　（Da）
S はリガンドのアナライト結合部位数

（例）	リガンドの分子量	50,000 Da
	リガンド固定化量	1,000 RU
	アナライト結合部位数	1
	アナライト分子量	20,000 Da
	理論的最大結合量	（Rmax）= 20,000 x 1,000 / 50,000 x 1 = 400 RU

濃度測定

固定化量はできるだけ多くする。目安として、タンパク質リガンドの場合、10,000RU 以上固定化する。固定化量を多くすると既知濃度アナライト測定時に得られる結合レスポンス RU vs C（濃度）をプロットした検量線の直線性が高くなる。

反応速度定数（ka,kd）、解離定数（KD）の算出

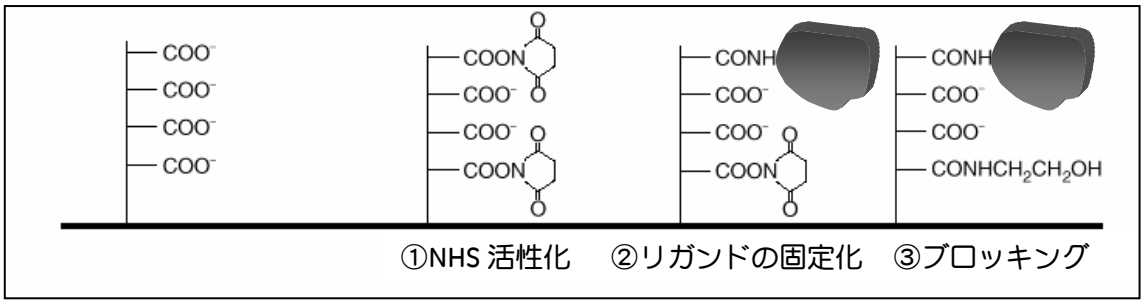
固定化量はできるだけ抑える。マストランスポートリミテーション（固定化量が多いことにより、アナライトの供給が追いつかない現象）を抑制するためである。至適固定化量は、以下の式から算出される最大と最小の固定化量（RU）の範囲となる。

最小固定化量（RU）
200 x 1/S x （リガンドの分子量／アナライトの分子量）
最大固定化量（RU）
1000 x 1/S x (リガンドの分子量／アナライトの分子量）
S はリガンドのアナライト結合部位数

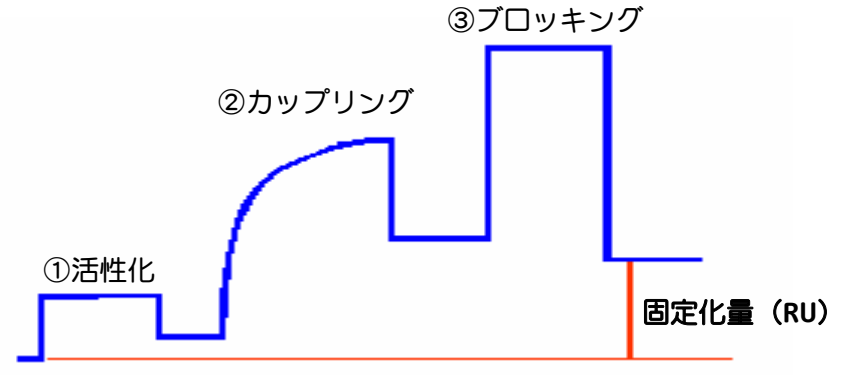
（例）	リガンドの分子量	50 kDa
	アナライトの分子量	100 kDa
	アナライト結合部位数	1
	最小固定化量	200 x 1/1 x（50,000/100,000）＝ 100 RU
	最大固定化量	1000 x 1/1 x（50,000/100,000）＝ 500 RU
	至適固定化量範囲	100～500RU

C-1. アミンカップリング法

リガンド表面に存在するアミノ基（N 末端アミノ基またはリジン ε -アミノ基）を利用して固定化する。CM デキストランのカルボキシル基を NHS（N-ヒドロキシスクシンイミド）で活性化し、至適な緩衝液で希釈したリガンドを固定化する。残った活性 NHS 基をエタノールアミンでブロッキングする。



（固定化センサーグラム）



準備するもの

アミンカップリングキット（BR-1000-50）

アミンカップリングキットには、以下の試薬が含まれている。

EDC (N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride)

NHS (N-hydroxysuccinimide)

1 M ethanolamine hydrochloride 溶液 (pH 8.5)

キットに添付されている説明書に従い、EDC および NHS はそれぞれ 10 ml の超純水に溶解する。直ちに 200 µl ずつを 11 mm プラスチックバイアルにそれぞれ分注し、ラバーキャップをして使用直前まで-20 ℃で冷凍保存する。使用直前に 1 組ずつの試薬を取り出して、融解させて使用する。融解後、試薬の再凍結はできない。エタノールアミンは、溶液で供給されるので冷蔵（4 ℃）保存する。200 µl ずつ小分けしておくか、使用する直前に分注する。

ランニング緩衝液

1 級アミンを含まない緩衝液。（トリスやグリシン緩衝液は避ける。）

リガンド

アジ化ナトリウム等の求核性物質を含まないもの。リガンドの安定化目的のために混入されている BSA（ウシ血清アルブミン）等のタンパク質類は予め除去する。

リガンド希釈液

10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液もしくは、10 mM Borate/1 M NaCl 緩衝液（pH 8.5）

リガンドの調製

リガンドがタンパク質の場合

濃度は 5～200 µg/ml 程度になるよう 10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液で希釈する。酢酸ナトリウム緩衝液の pH はリガンドの等電点より 0.5～2 低い pH を使用する。希釈用緩衝液として pH 3.5 以下のものは使用しない。

等電点が不明な場合は、固定化前に、至適な 10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液の pH を検討する。

濃縮効果が確認できない酸性タンパク質の場合は、サーフェスチオールカップリングもしくはリガンドをビオチン化後、センサーチップ SA に固定化する方法を検討する。

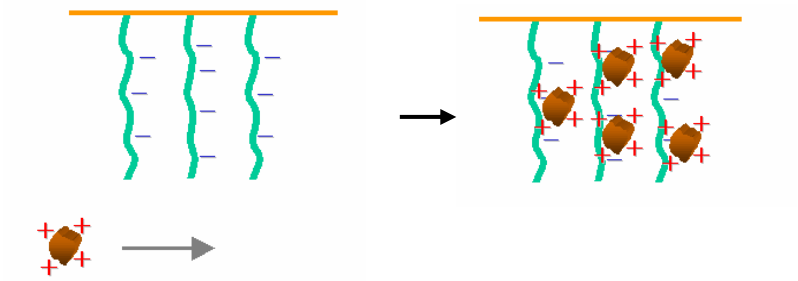
リガンドがペプチドや低分子物質の場合

100 µg/ml 以上の高濃度のリガンドを使用し、弱アルカリ性条件 10 mM Borate/1 M NaCl 緩衝液（pH 8.5）で希釈する。活性型 NHS 基とアミノ基との反応効率は、pH 8.5 前後がもっとも高い。

溶解性が低い低分子化合物を固定化する際には、DMSO などの有機溶媒存在下で固定化を実施する。有機溶媒を利用する際には、化学耐性を英語版マニュアル（Instrument handbook）で確認する。

C-2. リガンド希釈液の pH 選択

センサーチップ CM5 表面にコーティングされている直鎖デキストランにはカルボキシル基が導入されているため、表面は負に荷電している。リガンドを正に荷電した状態で添加すると、負に荷電している CM デキストランとの間に静電気的な結合が生じ、リガンドを CM デキストラン中に濃縮することができる。この条件を用いることで低濃度のリガンドをセンサーチップ表面に高濃度で供給でき、効率良く固定化できる。



等電点が既知のリガンドの場合

等電点よりも 0.5 以上低い pH を使用する。ただし、等電点が既知の場合であっても、高次構造の状態などにより、濃縮される pH が予想外に異なることもあるため、固定化前に、ウィザードの Immobilization pH Scouting により確認することをお奨めする。

等電点が不明な場合

ウィザードの Immobilization pH Scouting を実行し、希釈液の pH を検討する。この操作は、何も処理していないフローセル（固定化実施予定のセル）を使用して、各 pH におけるセンサー表面へのリガンドの濃縮度合いを評価する。この検討で、リガンドは固定化されない。検討後、引き続き、そのセルに固定化を行う。

リガンドは終濃度 5～200 ug/ml 程度になるよう 10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液で希釈する。Immobilization pH Scouting では、リガンド添加終了後、ランニング緩衝液に置換されると、通常は静電的に結合したリガンドはセンサーチップ表面から速やかに解離する。しかし、稀に、リガンドがデキストランに非特異的吸着を起こすため、リガンド添加終了後、洗浄溶液（50 mM NaOH）を添加し、吸着したリガンドの洗浄を行う操作が組み込まれている。

D. 相互作用測定

D-1. 相互作用測定の条件検討

リガンドの固定化が完了した後、アナライトの特異的結合の確認を行う。引き続き、再生条件の検討を行う。再生条件が決まったら、同一濃度のアナライトを添加し、再現性の確認を行う。

アナライト

リガンドを固定化したセンサーチップに対して、リガンドとの結合を測定する目的で添加する分子。血清や培養上清等のクルード（crude）なサンプルを使用できるが、不溶性の粒子等は遠心などで除去する。反応速度定数や解離定数算出を目的とした実験の場合は、精製したモル濃度が既知のアナライトが必要となる。

アナライトの調製

ランニング緩衝液で希釈する。希釈できない場合は、ランニング緩衝液でゲルろ過等を使用し緩衝液交換するか、ランニング緩衝液自体をアナライト溶解液条件に合わせることが必要となる場合がある。緩衝液が異なる場合には、溶液効果（Bulk Effect：ランニング緩衝液と添加溶液の密度の差により発生するレスポンスの差）が発生する。反応速度定数や解離定数の算出を目的とした実験においては、結合領域（アナライト溶解液）と解離領域（ランニング緩衝液）が異なる緩衝液組成条件下の測定になり、解析結果に影響を与える。

アナライト濃度は結合の強さや分子量にもよるが、数十 ng/ml～数百 ug/ml で行う。反応速度定数を算出する場合には、予想される KD（解離定数）値濃度の 1/10～10 倍の濃度で解析すると良好な結果が得られる。予備検討時は、結合が弱いことや再生条件（リガンドに結合したアナライトを溶出し、リガンド固定化表面を固定化直後の状態に再生する操作）を検討する必要性を考慮し、高濃度アナライト（タンパク質アナライトの場合、数～数十 ug/ml）を用いるのが望ましい。

リファレンスセル

溶液効果および非特異的吸着を差し引くために、必ずリファレンスセルへもアナライトを添加する。リファレンスセルは、未処理のセル、活性化・ブロッキングセル、ネガティブコントロール固定化セルなどを利用する。

再生溶液

リガンドに結合したアナライトを強制的に解離させる操作を再生という。解離が速い相互作用では、ランニング緩衝液が流れることで、短時間でアナライトが完全に解離するため再生の必要がない。解離速度が遅い相互作用の場合には、適当な塩、酸、アルカリ溶液をアナライト結合表面に 30 秒～1 分間添加し再生を行う。至適な再生条件（どの溶液で何分間、何回添加するか）は、分子間ごとに異なるため、その都度検討が必要となる。

理想的な再生条件

リガンドの活性が失われない

アナライトが完全に解離する

リガンドがセンサーチップ表面から遊離しない

再生溶液は通常以下のようなものが使用される。検討の際にはマイルドな条件から検討を行う（塩溶液→酸溶液→アルカリ溶液）。添加時間は、1 分以内で検討する。

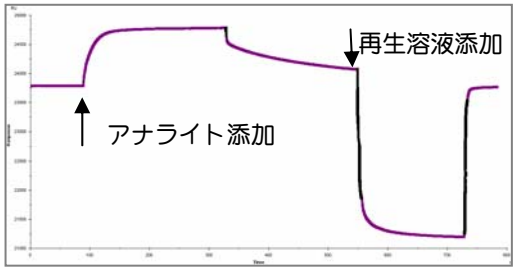
試薬	濃度あるいは pH
塩	
NaCl	< 2 M
酸性条件	
10 mM Gly-HCl	> pH 1.5
HCl	< 100 mM
Phosphoric acid	< 100 mM
Formic acid	< 20 %
アルカリ条件	
10mM Gly-NaOH	< pH 12
NaOH	< 100 mM
Ethanolamine	< 100 mM
Ethanolamine-HCl	< 1 M
キレート剤　多価カチオン依存性反応の場合	
EDTA	< 0.35 M
界面活性剤	
Surfactant P-20 (Tween 20)	< 5 %
Triton X-100	< 5 %
SDS	< 0.5 %
Octylglucoside	< 40 mM
有機溶媒	
Acetonitrile	< 20%
DMSO	< 8%
Ethyleneglycol in HBS buffer	< 50%
Ethanol	< 20%
Formamide	< 40%
変性剤	
Guanidine-HCl	< 5M
Urea	< 8M

D-2. 反応速度定数・解離定数の求め方

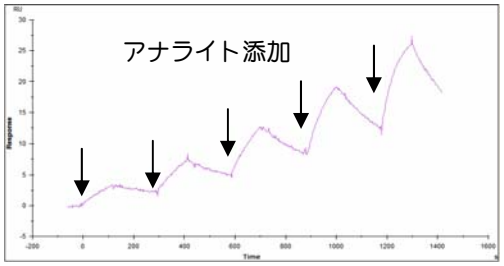
マルチサイクル法とシングルサイクル法

1 濃度のアナライト添加とリガンドの再生操作を 1 サイクルとして、濃度が異なるアナライトを繰り返し測定し、得られたセンサーグラムから反応速度定数・解離定数を算出する方法をマルチサイクル法と呼ぶ。一方、異なるアナライト濃度系列を再生操作なしに連続添加し、得られたセンサーグラムを利用して反応速度定数・解離定数を算出する方法をシングルサイクル法と呼ぶ。

マルチサイクル法



シングルサイクル法



アフィニティーとカイネティクス

分子同士が相互作用する時には、両者にはアフィニティー（親和性）があると表現する。解離定数は、アフィニティーの強さを表す尺度として一般的に使用され、K_D（単位 M）として記述される。その逆数 1/ K_D（= K_A、単位 1/M）が用いられることもある。解離定数は、A+B⇔AB 反応の平衡状態において、K_D = ［A］［B］/［AB］と定義される。形成される複合体の割合が多いほど、つまり、この数値が小さいほどアフィニティーは強い。Biacore を用いたカイネティクス解析では、アフィニティーは、その分子間の反応速度定数から算出する（ $K_D = k_d / k_a$ ）。速い結合および遅い解離の相互作用ほどアフィニティーは強い。これら反応速度（カイネティクス）に関するパラメータは、結合速度定数（k_a、単位 $M^{-1}s^{-1}$）、解離速度定数（k_d、単位 s^{-1}）として表現される。

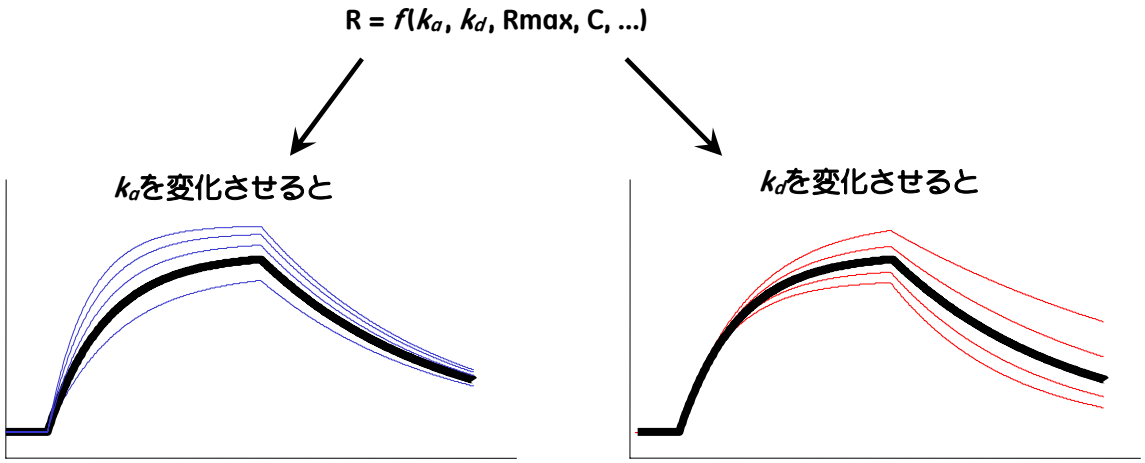
$$A + B \underset{k_d}{\overset{k_a}{\rightleftharpoons}} AB$$

$$K_D = k_d / k_a$$

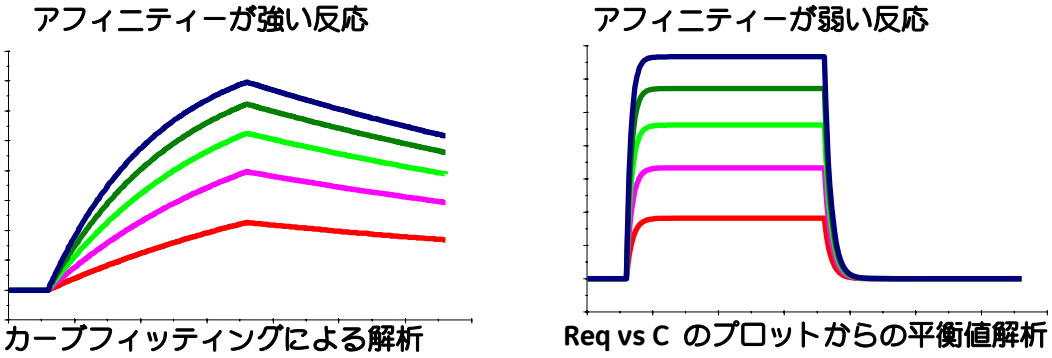
$$K_A = k_a / k_d$$

解離定数（K_D ）、反応速度定数（k_a,k_d ）の算出方法

カイネティクス解析では、得られたセンサーグラムに直接反応速度式をカーブフィッティングさせ、非線形最小二乗法により定数を導き出す。

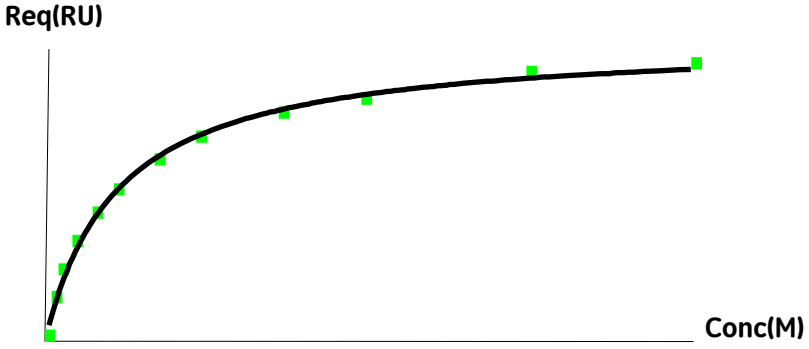


アフィニティーが弱い（≒解離が速い）相互作用の場合、反応はきわめて速く平衡状態(Req)へと移行するが、複合体の安定性は悪いため、センサーグラムは『箱型』となる。結合領域および解離領域は極めて短く、カーブフィッティングによる反応速度定数の算出は困難である。



このような場合、アナライト濃度（C）に対する平衡値（Req）のプロットから、親和定数（KA）あるいは解離定数（KD）を算出する。平衡状態では、以下の関係式が成り立つ。

$$Req = C \times Rmax / (C + K_D)$$



至適なアナライト濃度

良好な結果を得るためには、予想される解離定数（K_D）値の 1/10～10 倍の濃度範囲で測定する。結合速度または解離速度が遅く、結合領域のセンサーグラムの傾きが直線的な場合には、センサーグラムのカーブが得られる高濃度領域まで測定すると良好な解析結果が得られる。マルチサイクル法の場合は、5 段階以上の濃度系列と濃度 0（アナライトを含まない緩衝液のみ）について測定し、1 濃度については再現性の確認目的で 2 回（n=2）測定する。解離定数値が不明な場合は、1 濃度解析を実行し、算出された暫定的な K_D 値から、至適濃度範囲を求める。

シングルサイクル法の場合も、予想される解離定数（K_D）値の 1/10～10 倍の濃度範囲で、5 段階の濃度系列と、濃度 0 を 2 回測定する。解離定数値が不明な場合には、1nM～1uM の範囲で、5 倍希釈系列の 5 濃度のアナライトで測定および解析を行い、算出された暫定的な K_D 値から至適濃度範囲を求めると良い。その場合、再生ができるのであれば、リガンドを再生して、至適アナライト濃度で再測定を行う。再生ができないのであれば、リガンドを新しいフローセルに固定化し、至適アナライト濃度で再測定を行う。

アフィニティーが弱く、箱型のセンサーグラムになり、カイネティクス解析が困難な場合は、10 段階以上の濃度系列と濃度 0 について測定する。濃度範囲は高濃度側まで幅広くとることを推奨する。

至適な流速

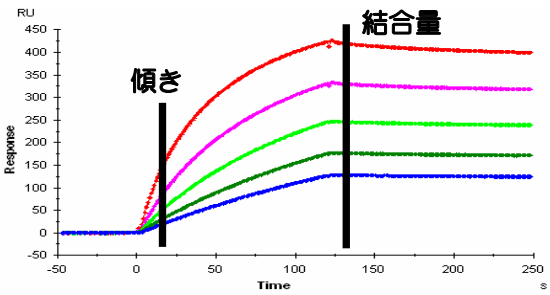
30～60 µl/min の高流速に設定する。

アナライト添加時間と解離時間

通常は、添加 3 分程度、解離 3 分程度であれば良い。ただし、結合速度または解離速度が遅く結合領域のセンサーグラムが直線的な場合には、センサーグラムのカーブを得るために、添加時間を 5～10 分程度にすると良い。また、解離速度が遅く、解離領域の傾きがほとんど確認できない場合には、解離時間を 10～30 分程度にすると良い。

D-3. ビアコアを用いた濃度測定の原理

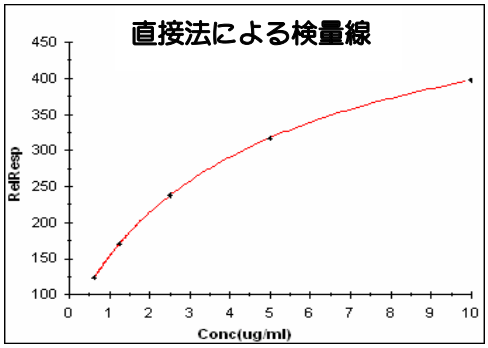
原理



定量したい分子（A）に対して親和性を持つ分子（B）が必要となる。B を固定化したセンサーチップ表面に A を添加すると、濃度に依存した結合レスポンス（RU）が得られる。数段階の濃度既知の A を添加し、その結合レスポンスを得て、検量線（RU vs C）を作成する。濃度未知の A に対しても同様に添加し、その結合レスポンスを検量線にフィッティングすることで、濃度を算出する。また、A 添加直後のセンサーグラムの傾き（Slop）も結合レスポンス同様に、添加した A の濃度を反映し、Slop vs C の検量線からも定量ができる。

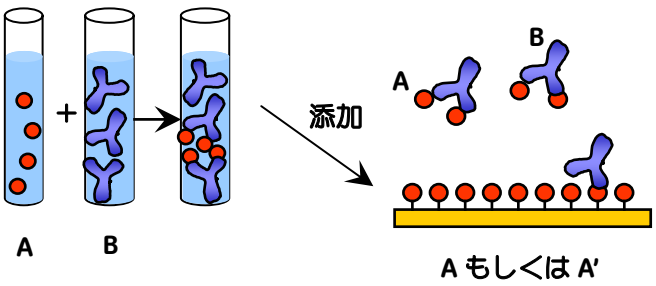
（直接法）

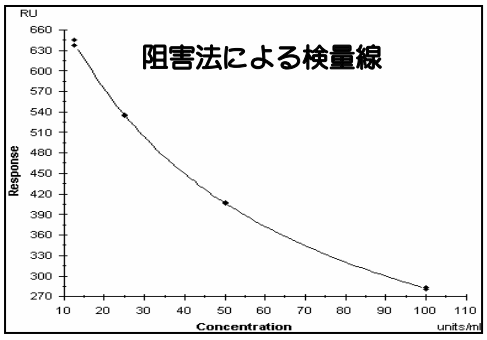
親和性を持つ分子（B）をセンサーチップ表面に固定化し、定量分子 A を添加して得られる結合レスポンスから直接 A の濃度を算出する方法。



（阻害法）

A もしくは A のアナログ（A’）をセンサーチップに固定し、定量分子 A と A に対して親和性を持つ分子 B(抗体など)を一定量混合した混合液を添加し、未反応の B を測定することで、間接的に存在する A の濃度を求める方法。化合物やペプチドなど分子量が小さい分子の定量を行う場合に利用する。





1. セットアップ

1-1. 電源およびソフトウェアの起動

1-1-1. 電源の立ち上げ

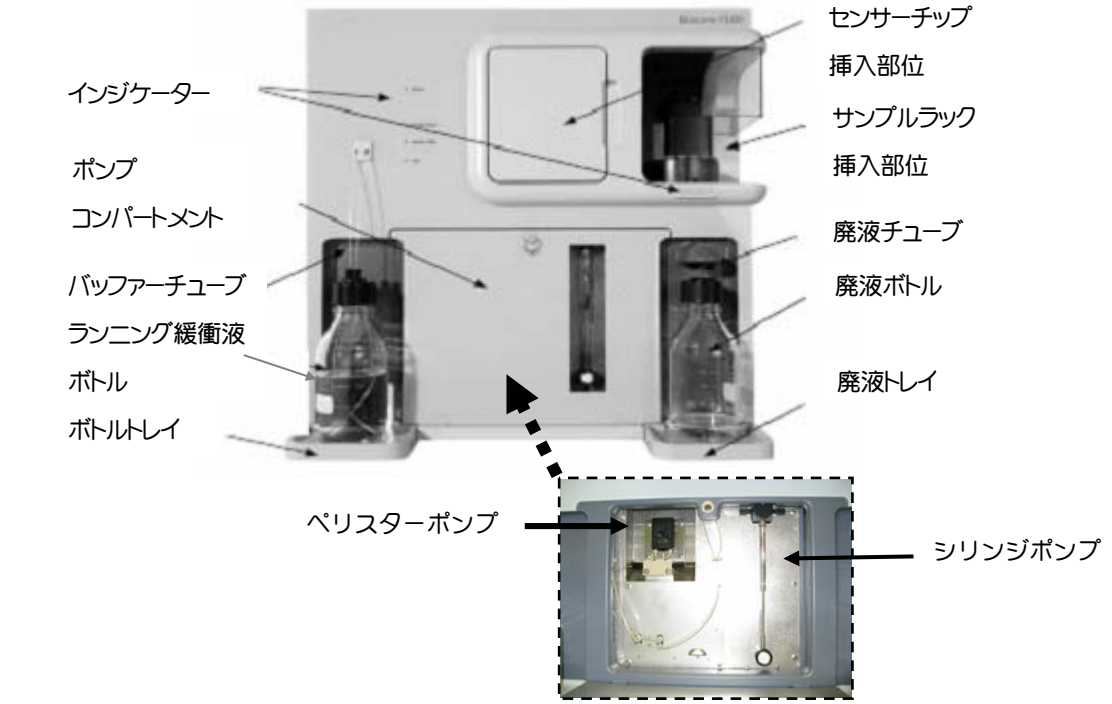
テーブルタップの電源 → プリンター → モニター画面 → システム本体 → コンピューターの順番に電源を入れる。パスワード(biacore)を入力し、Windows を立ち上げる。

注）システム本体の電源を入れると、本体の全面左上にある全てのインジケーター（LED ランプ）が数秒間点灯し、リセットされて消える。その後 power のインジケーターが点灯し、temperature のインジケーターは点滅する。

1-1-2. ランニング緩衝液、廃液ボトルのセット

本体に向かって、左側トレイにランニング緩衝液ボトルをセットし、バッファーチューブを 2 本とも挿入する。1 日の実験にランニング緩衝液が約 200 ml 必要。水分の蒸発を防ぐため、必ずボトルキャップをする。また、右側トレイに廃液ボトルをセットし、廃液チューブを挿入しボトルキャップをする。

補足 1-1. 装置の配置



1-1-3. ペリスターポンプのセット

装置前面下のカバーを開け、ペリスターポンプのカバーを閉じる。

補足 1-2. ランニング緩衝液の種類

各種ランニング緩衝液を発売している。

HBS-EP+ 10X　（50 ml 4 本, BR-1008-26）
0.1 M HEPES, 1.5 M NaCl, 30 mM EDTA, 0.5 % v/v Surfactant P 20
⇒使用の際には、超純水で 10 倍希釈する。

HBS-P+ 10X　（50 ml 4 本, BR-1008-27）
0.1 M HEPES, 1.5 M NaCl, 0.5 % v/v Surfactant P 20
⇒使用の際には、超純水で 10 倍希釈する。

HBS-N 10X　（50 ml 4 本, BR-1008-28）
0.1 M HEPES, 1.5 M NaCl
⇒使用の際には、超純水で 10 倍希釈する。

HBS-EP　（200 ml, BR-1001-88）
0.01M HEPES, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005 % v/v Surfactant P 20, pH7.4

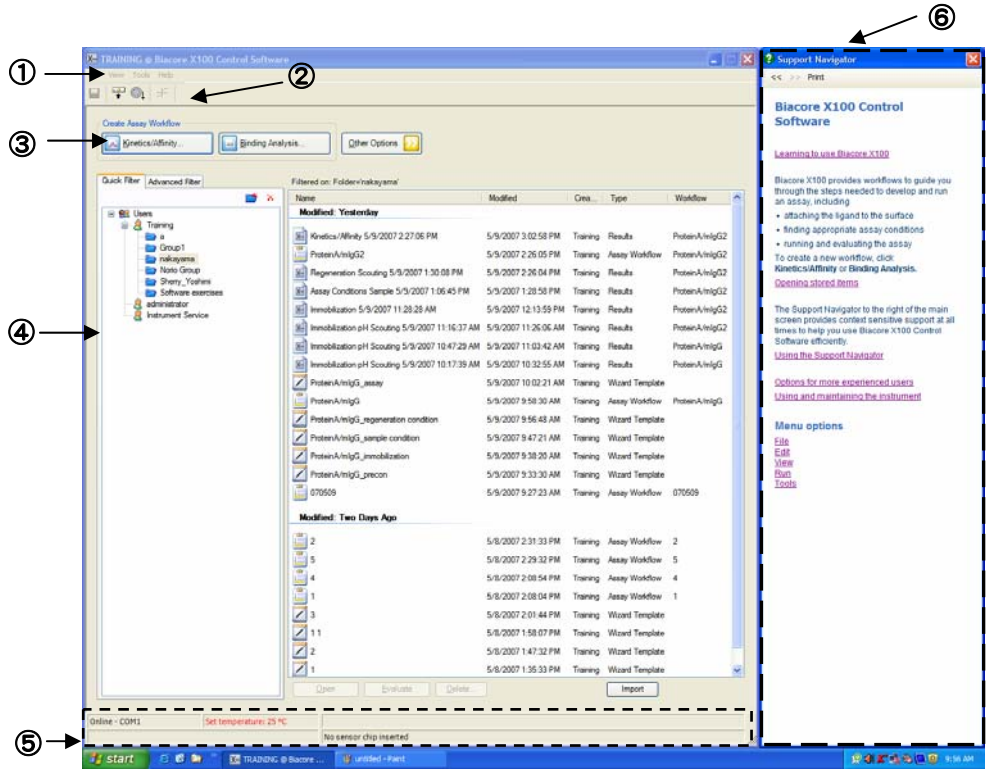
HBS-P　（200 ml, BR-1003-68）
0.01 M HEPES, 0.15 M NaCl, 0.005 % Surfactant P 20, pH7.4

HBS-N　（200 ml, BR-1003-69）
0.01 M HEPES, 0.15 M NaCl, pH7.4

実験目的にあわせ、緩衝液の変更は可能である。各自で調製する場合には、0.22 um フィルターでろ過する。

1-1-4. コントロールソフトウェアの起動

モニターの初期画面中の左下の **Start→Programs→Biacore→BIACORE X100 Control Software** のアイコンをクリックする。ユーザー名とパスワードを入力する。スタートビューウインドウが開く。



① メニューバー　Biacore X100 で実行可能な殆どの操作コマンドが含まれる。

② ツールバー　使用頻度の高いコマンドをアイコン化しており、簡便にコマンド操作を選択できる。その時点で実行可能なコマンドのみ選択可能。

③ アッセイボタン　アッセイコマンドがアイコン化されている。

④ フィルタータブ　"Quick Filter"にデータベースを表示。"Advanced Filters"でデータの検索が可能。

⑤ ステータスバー　現在のシステムの状態を表示。システムとの接続状況 、システム温度、センサーチップの種類 、実行状態など。

⑥ サポートナビゲーター　用語やアイコン等の説明や実験手順、解析結果の評価等をサポート。また、ウェブにリンクし、サポート情報の入手やホームページにアクセス可能。必要がない場合には、ウインドウ右上の をクリックすると閉じる。

補足 1-3. ファイルのアイコン

Quick Filter には、以下のファイルが表示される。
ファイルの種類によって付属のアイコンが異なる。

コントロールソフトウェアで保存した測定ファイル

コントロールソフトウェアで保存したワークフローファイル

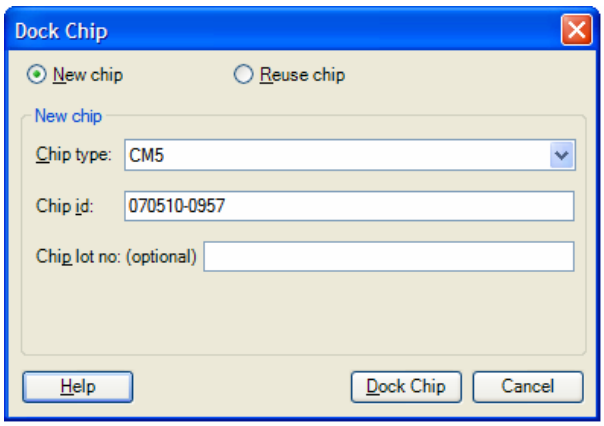
コントロールソフトウェアで保存したウィザードファイル

解析ソフトウェアで保存したファイル

1-2. システムの初期化

1-2-1. センサーチップの挿入

コントロールソフトウェアを起動すると **Dock Chip** ダイアログが表示される。



↓

新品のセンサーチップを使用する際は、〇**New chip** に、再利用のセンサーチップの場合は、〇**Reuse chip** にチェックを入れる。（再利用のセンサーチップを使用する場合は、補足 1-4.を参照。）

↓

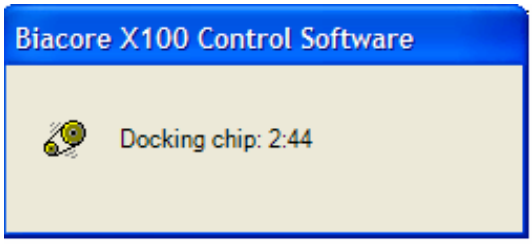
Chip type のプルダウンメニューをクリックして、使用するセンサーチップの種類を選択する。**Chip id** は日付と時間が自動入力される（変更可能）。必要に応じて、**Chip lot no** を入力する。

↓

本体上部のセンサーチップ挿入部位の扉を開け、スライダーを手前に引きセンサーチップをセットする。スライダーを装置に挿入する。インジケーターの **sensor chip** が点滅する。

↓

Dock Chip ダイアログの **Dock Chip** をクリックする。



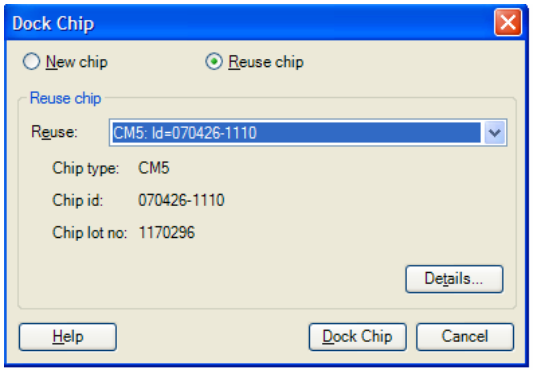
Dock が完了（インジケーターの **sensor chip** が点灯する）して、自動的に **Standby** 状態になる。**Standby** とは、セットしたランニング緩衝液を低流速で流し続けるモード。最長 7 日間継続する。

補足 1-4. センサーチップ挿入時の注意事項

冷蔵庫に保存しているセンサーチップは、室温に戻した後に **Dock** する。
センサーチップ内のプラスチックシートがセンサーチップのカバーにしっかり収まっていることを確認してから挿入する。
Dock 状態でセンサーチップを装置から取り出さない。
センサーチップを取り出す必要がある場合は、ツールバーの **Undock sensor chip** アイコン（ ）をクリックする。インジケーターの **sensor chip** が点滅したら、センサーチップを取り出す。

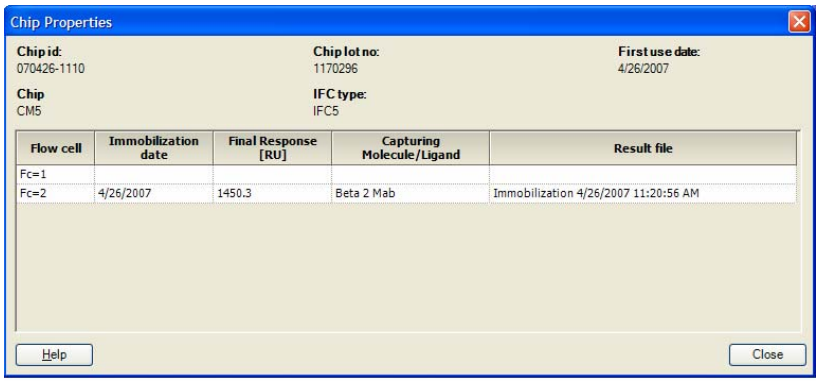
補足 1-5. センサーチップの固定化履歴

再利用のセンサーチップを使用する場合は、〇**Reuse chip** にチェックを入れる。
Reuse:で、そのセンサーチップに対応した **id** 番号を選択する。



↓

Details...をクリックすると、固定化履歴が表示される。



↓

確認後、**Close** をクリックする。

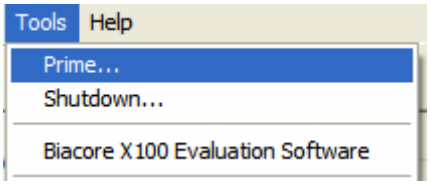
補足 1-6. センサーチップの種類

Biacore X100 システムで使用可能なセンサーチップは以下の通り。
各センサーチップの詳細は弊社総合カタログ等を参照のこと。

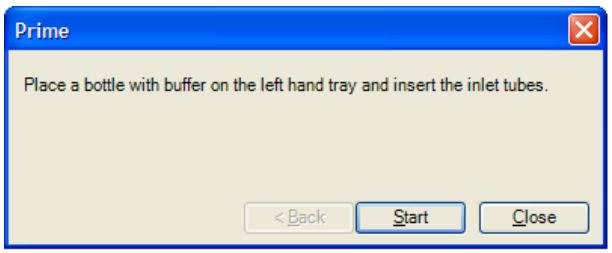
カルボキシル基タイプ	タンパク質、ペプチド、化合物などの固定化	
Sensor Chip CM5（certified）	3 枚	BR-1000-12
Sensor Chip CM5（research grade）	3 枚	BR-1000-14
Sensor Chip CM5（research grade）	1 枚	BR-1003-99
Sensor Chip CM4	3 枚	BR-1005-39
Sensor Chip CM3	3 枚	BR-1005-41
Sensor Chip C1	3 枚	BR-1005-40
ストレプトアビジンタイプ	ビオチン標識の DNA やペプチドなどの固定化	
Sensor Chip SA	3 枚	BR-1000-32
Sensor Chip SA	1 枚	BR-1003-98
疎水基タイプ	リン脂質、糖脂質、膜タンパク質などの固定化	
Sensor Chip HPA	3 枚	BR-1000-30
Sensor Chip HPA	1 枚	BR-1004-06
Sensor Chip L1	3 枚	BR-1005-43
Sensor Chip L1	1 枚	BR-1005-58
金属キレートタイプ	His-tag タンパク質の固定化	
Sensor Chip NTA	3 枚	BR-1000-34
Sensor Chip NTA	1 枚	BR-1004-07
金表面のみのタイプ		
Sensor Chip Au	3 枚	BR-1005-42

1-2-2. ランニング緩衝液による平衡化

メニューバーの **Tools** → **Prime...**を選択する。



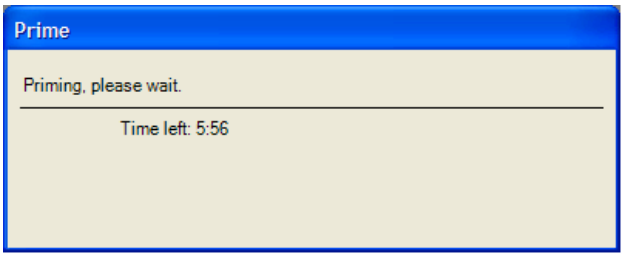
↓



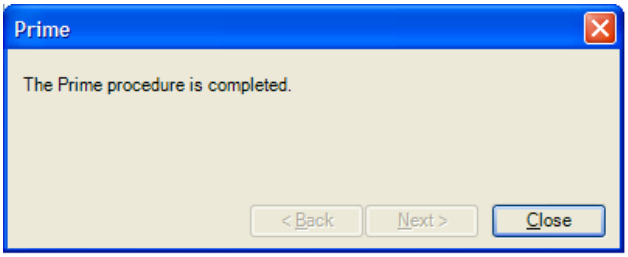
ランニング緩衝液および廃液入れを確認後、**Start** をクリックする。

↓

Prime がスタートする。



↓



Close をクリックする。

自動的に **Standby** 状態になる。

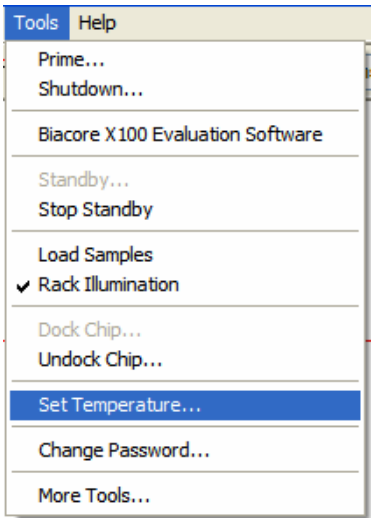
補足 1-7. 実験途中のランニング緩衝液の交換

Prime は、ポンプやマイクロ流路系、オートサンプラー等をランニング緩衝液で洗浄、置換する操作である。実験開始時や実験の途中でランニング緩衝液を変更する場合には必ず実行する。

1-2-3. 温度設定

測定温度を設定する。

メニューバーの **Tools** → **Set Temperature...**を選択する。



↓

4 ℃～40 ℃の範囲で設定して、**OK** をクリックする。

補足 1-8. 設定温度と実際の温度

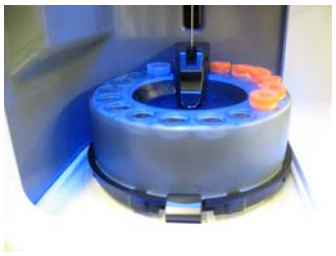
設定温度に達していない場合は画面上の Status bar 中の温度表示が赤の点滅、本体インジケーターの temperature ランプが橙色に点滅する。設定温度で安定した場合には、画面上の温度の表示が黒、インジケーターの temperature ランプは点灯に変わる。

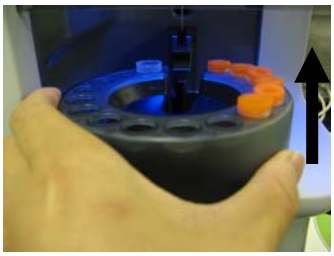
温度が完全に安定するには、ある程度時間を要する。室温が測定温度と大きく異なる場合は、予めシステムの電源を入れておく。

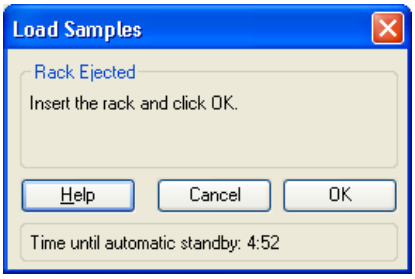
1-2-4. サンプルのセットとラックの取り出し

すべてのサンプルは、ラックにセットする。ラックを取り出すには、ツールバーの **Load Samples** アイコン（ ）をクリックする。システム本体前面の **rack locked** のランプが消えるとラックを取り出すことができる。**rack locked** のランプが点灯している際は、ラックを取り出すことができないので注意する。
ラックを真上に持ち上げ取り出す。

↓



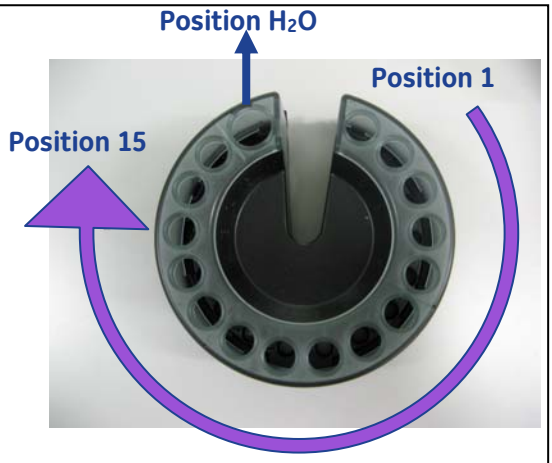




画面上に **Rack Ejected** ダイアログが表示される。ラックをセット後、**OK** をクリックする。
13 秒後にロックが完了し、**rack locked** のランプが点灯する。
なお、ラックベースのライトの点灯は、**Tools** → **Rack Illumination** で選択可能。

補足 1-9. ラックとバイアル

ラックには、サンプルバイアルを 15 本（position 1 から position 15 まで）とニードル洗浄に利用する MilliQ 水/バイアル（position H2O）を 1 本セットできる。

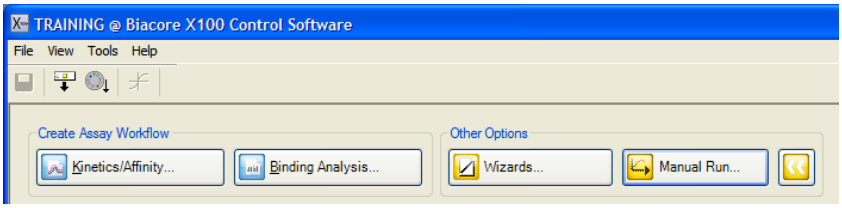


ラックには次のバイアルがセットできる。専用のキャップを利用する。パラフィルムなどニードルの穴を塞ぐ可能性のあるシールは使用しない。

Rack position	1-15	H_2O
キャップ	Rubber caps, type 2 BR-1004-11	不要
バイアル	1.5ml Plastic Vials BR-1002-87	15mm Plastic Vials BR-1006-54

1-3. 測定モード

Biacore X100 システムは 3 つのモードで測定できる。
各測定モードは、コントロールソフトウェア上部のアイコンで選択する。

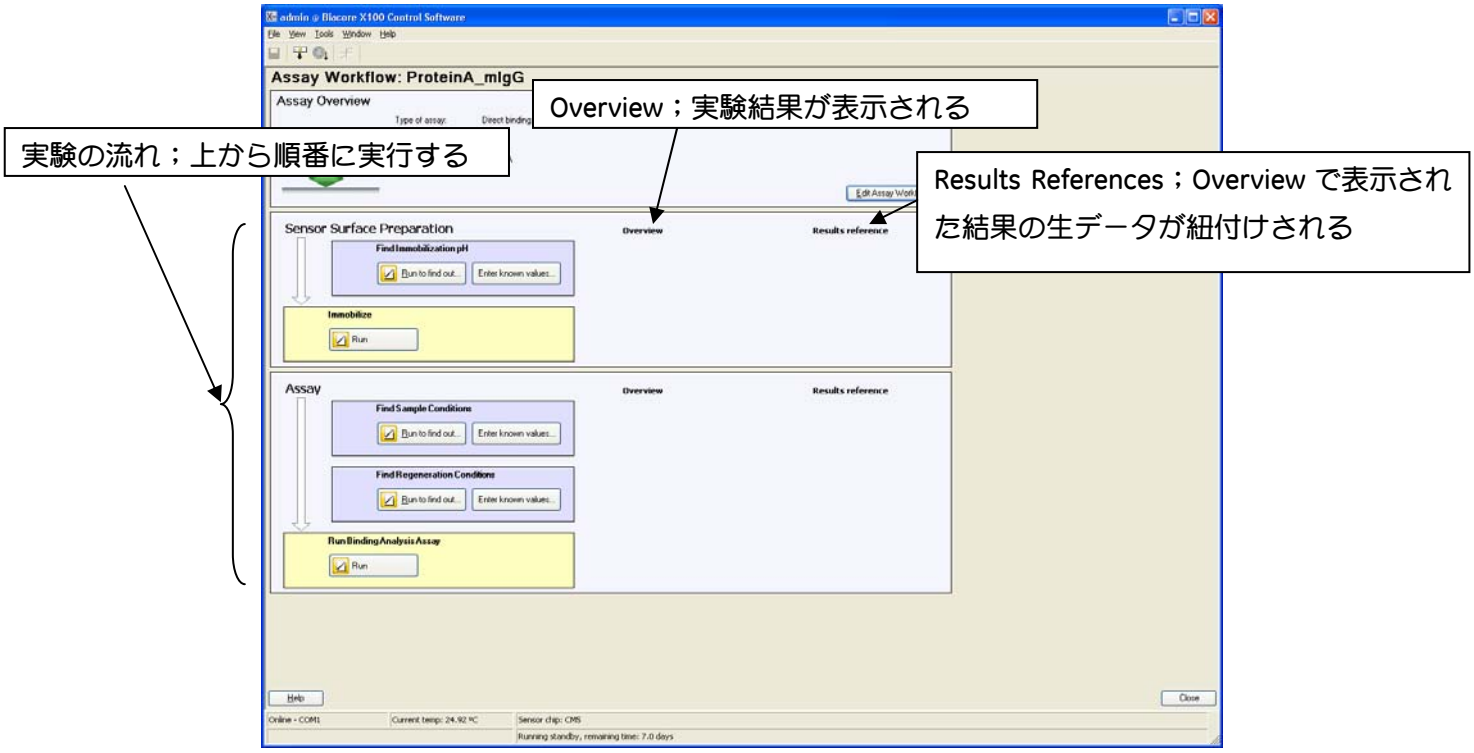


マニュアルモード

画面上のアイコンを使い、測定を行いながら操作する。簡単な検討など、数回の添加で完了する試験を行う場合に有効。詳細は、第 2 章を参照。
（＊取得データは、解析ソフトウェアで解析することができないので注意する。）

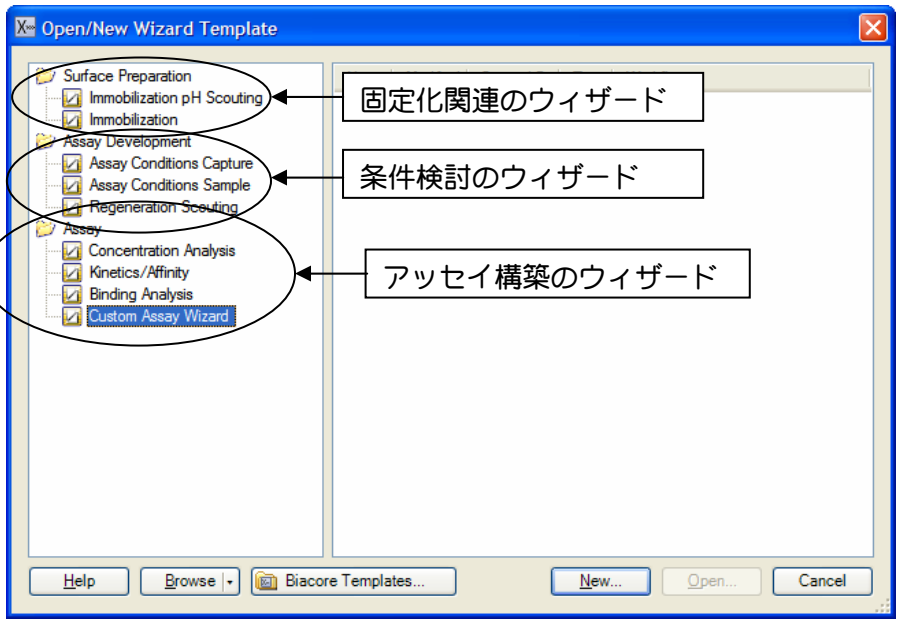
ワークフローモード

実験ノートを使用する場合と同じ感覚で、実験結果を記録することができる。初めてビアコアの実験をする場合でも、流れに沿って各ステップを実行すれば、データの取得までたどり着くことができる。実験の流れが表示され、さらに各ステップから実験プログラムの作成および実行が可能である。また、得られた結果が紐付けされるので、結果の再確認で間違えることがない。BiacoreX100 では、反応速度定数の算出実験およびスクリーニング実験については、ワークフローが存在する。



ウィザードモード

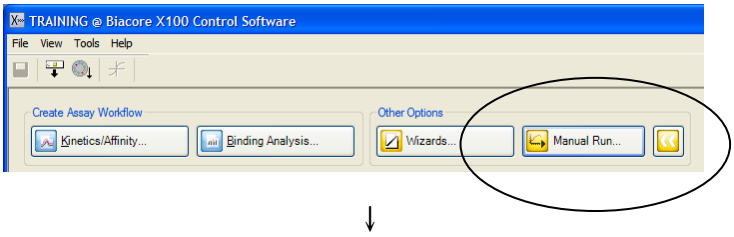
ガイダンスに従いながら、任意の実験条件を入力して実行させるオートモード。ワークフローに紐付けされているプログラムも、ウィザードが基本になっている。ワークフローを使用せず、実験内容に応じてプログラムを作成する場合、ワークフローより自由度の高いアッセイを構築する場合に有効。



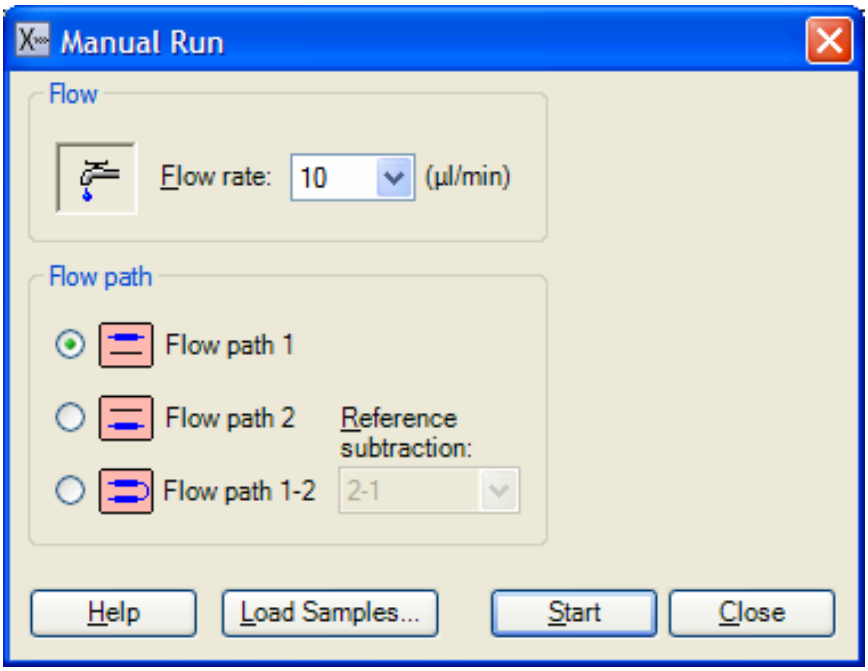
2. 基本操作（マニュアルモード）

2-1. 測定の開始

Other Options の **Manual Run...**をクリックする。



↓



Manual Run ダイアログが表示される。

Flow rate:　をクリックして、5、10、30 µl/min より選択する。(固定化の際は 10ul/min、反応速度定数の算出実験の条件検討の際は 30 µl/min を選択。)

Flow path:　測定を行うフローセルを選択する。

Flow path1　　フローセル 1 のみ測定

Flow path2　　フローセル 2 のみ測定

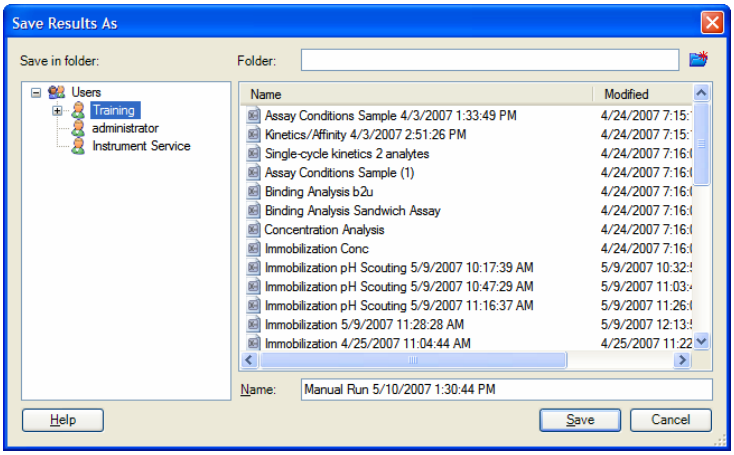
Flow path1-2　　フローセル 1 および 2 を測定

Reference subtraction のプルダウンメニューで 2-1 を選択すると、自動差し引きしたセンサーグラムを表示することができる。

Load Samples...をクリックする。

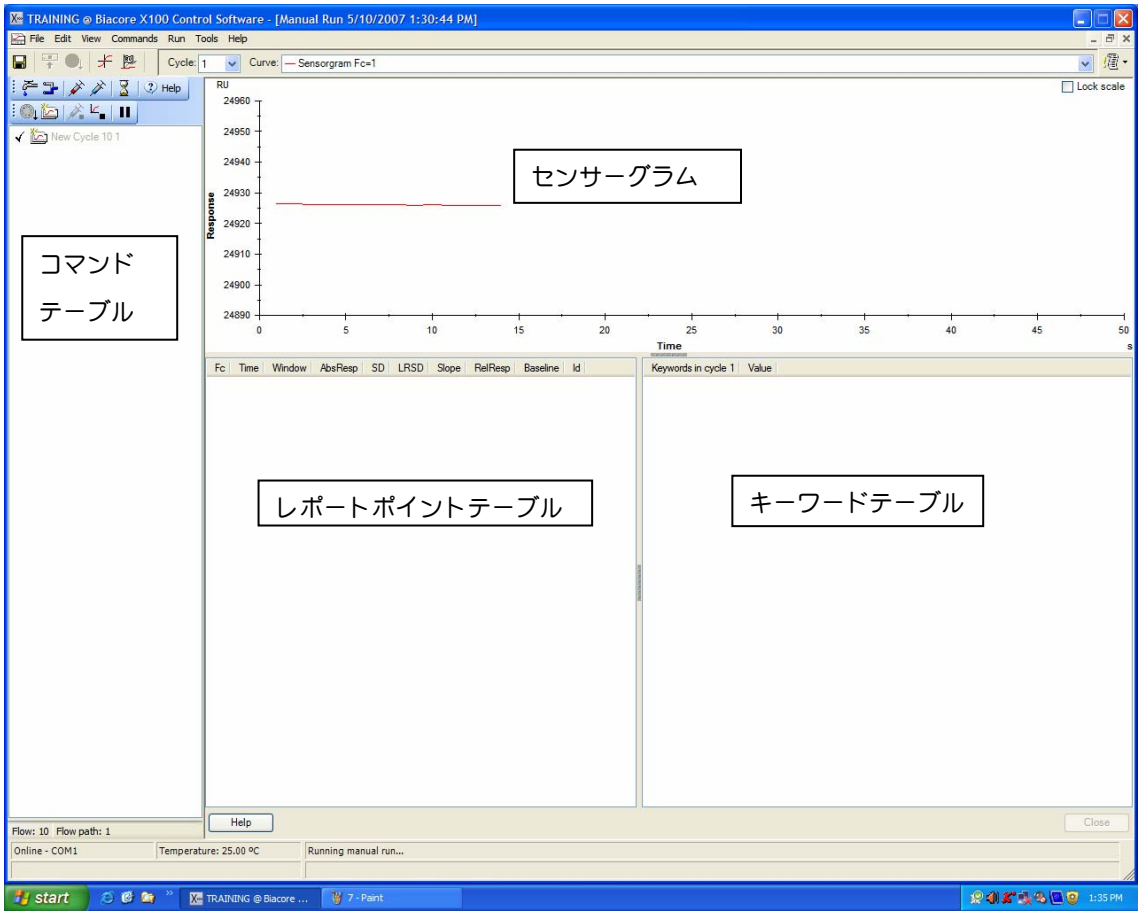
ロックが解除される。装置右上の“**rack locked**”のランプが消えてから、サンプルラックを取り出す。ラックにサンプルをセットし、ラックを装置に戻す。OK をクリックする。
引き続き、**Manual Run** ダイアログの **Start** をクリックする。

↓



結果の保存先を指定し、ファイル名を入力する。(第 9 章参照)
Save をクリックすると、測定が開始する。

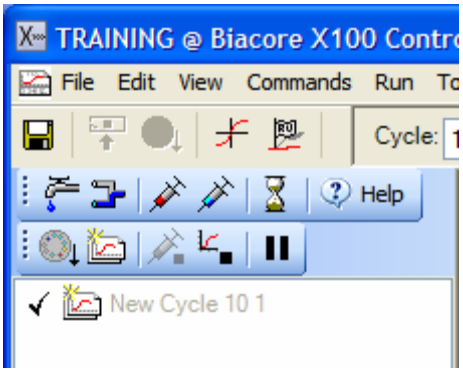
↓



センサーグラムが表示され、測定が開始する。

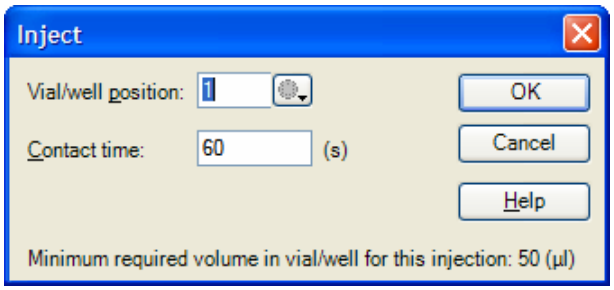
2-1-1. サンプルの添加

画面左上のアイコンを選択して、測定コマンドを指定する。(各コマンドの説明は補足 2-1. を参照。または、 Help をクリックしサポートナビゲーターを参照する。)



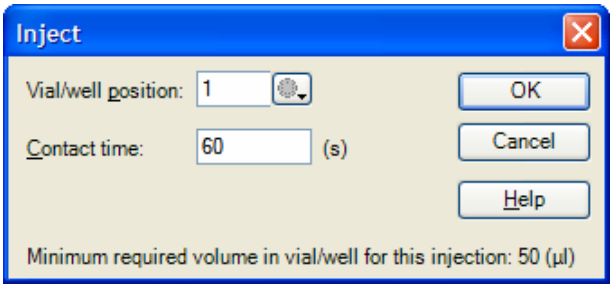
サンプルを添加する際は、**Injection command**（ ）をクリックする。

↓



Vial/well position:の（ ）をクリックし、サンプルをセットする位置にマウスを移動しクリックする。

↓



Contact time:にサンプル添加時間（秒）を入力すると、必要量がダイアログ下部に表示される。バイアル内に必要量があることを確認して、**OK** をクリックする。

補足 2-1. コマンドの説明

；流速の選択（流速 5、10、30 µl/min から選択）

；流路の切り替え（Detection1,2 に設定している場合利用可能）

；サンプル添加

；再生溶液添加

；待機（次の操作コマンドを実行するまでの時間を任意で設定できる）

；ヘルプボタン（Support Navigator を表示）

；サンプルラックの取り出し

；サイクルの切り替え。センサーグラムを新たにスタートする。

；添加の中止（サンプルおよび再生溶液添加時に実行可能）

；測定の終了（全てのコマンドの実行後に、自動で Standby 状態に入る）

；一時停止（予約コマンドの一時停止が可能）

；再スタート（一時停止の解除）

コマンドは、コマンドテーブルに任意で追加が可能。追加されたコマンドは、上から順番に実行される。実行中のコマンドは、( )が付く。実行が終了したコマンドは、(✓)が付く。

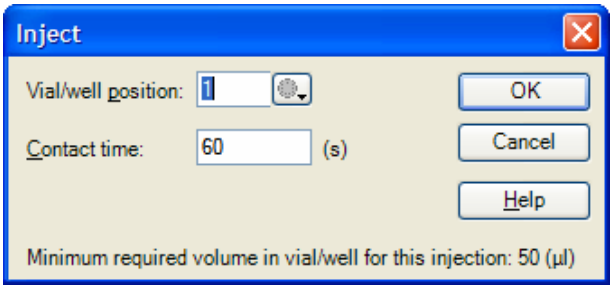
（この時点でサンプルをラックにセットする場合は、一旦、**Cancel** をクリックし、**Inject** ダイアログを解除する。）

↓

Load Samples アイコン（ ）を選択する。

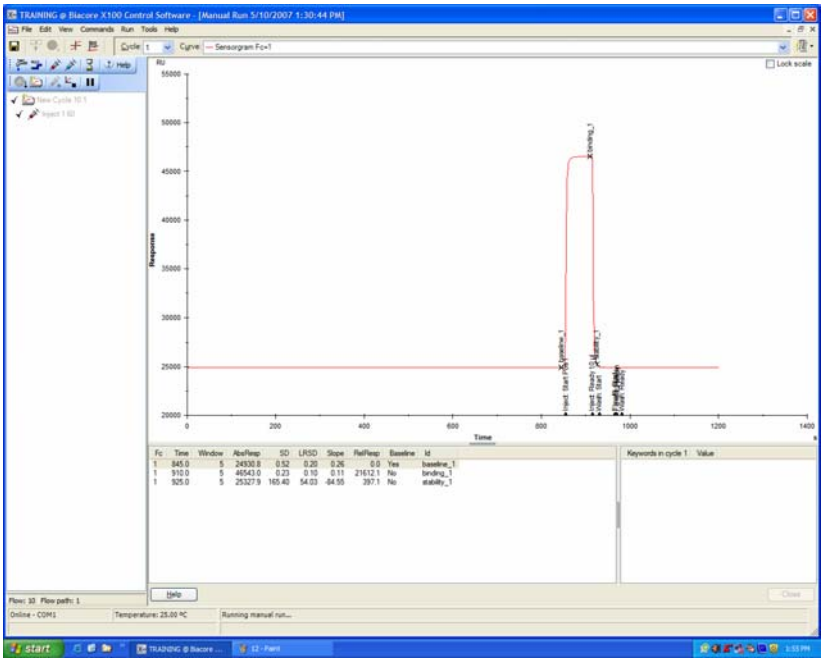
ラックを取り出し、適切な量のサンプルを分注したバイアルをセットする。
ラックを再び装置にセットし、**OK** を選択する。再び、**Injection command**（ ）をクリックする。

↓



サンプル位置および添加時間（秒）を入力する。

↓



コマンドテーブルに **Injection command** マークが追加され、添加が開始される。

↓

必要に応じて、引き続きサンプルを添加する。

補足 2-2. イベントログ

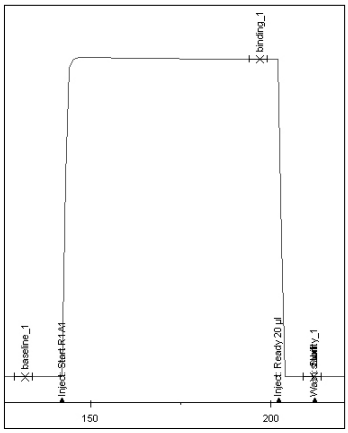
センサーグラムの X 軸上には、試料添加開始・終了や流路の洗浄などのログも自動入力される。センサーグラム右上の（ ）をクリックするとイベントログの詳細を確認できる。

2-1-2. レポートポイントの追加

任意の時間におけるシグナルの値(RU)をレポートポイントという。レポートポイントは、レポートポイントテーブルに表示される。レポートポイントはサンプル添加前後で自動取得されるが、任意で追加することができる。

補足 2-3. 自動取得されるレポートポイント

サンプル添加を行った場合、自動的に次の時点でのレポートポイントがレポートポイントテーブルに取得されている。



（レポートポイントテーブル）

Fc	Time	Window	AbsResp	SD	LRSD	Slope	RelResp	Baseline	Id
1	132.0	5	36881.6	0.09	0.10	0.00	0.0	Yes	baseline_1
1	197.0	5	59602.6	2.58	0.23	-1.38	22721.0	No	binding_1
1	212.0	5	36879.7	0.16	0.14	-0.05	-1.9	No	stability_1

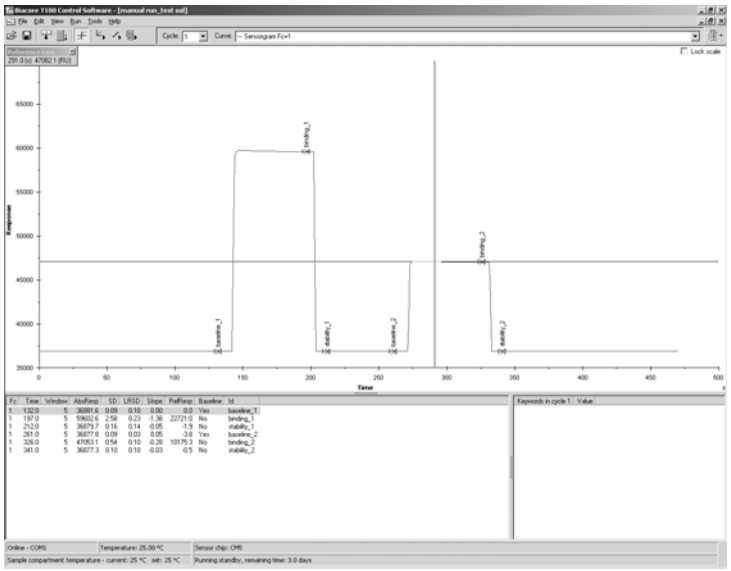
Id（レポートポイント名）

baseline_1	開始 10 秒前
binding _1	終了 5 秒前
stability _1	終了 10 秒後

“baseline_1”時のセンサーグラムの高さ（RU）は “0（ゼロ）RU”（RelResp 0.0）に自動設定される。“binding_1”もしくは“stability_1”の RelResp は、“baseline_1”からの相対値（RU）を示している。

2 つ目のサンプル添加時のレポートポイント名は、“baseline_2”“binding_2” “stability_2”となり、RelResp は、“baseline_2”からの相対値（RU）となる。

ツールバーの **Reference line**（ ）またはメニューバーの **View** → **Reference Line** をクリックして、センサーグラム上にリファレンスラインを表示する。

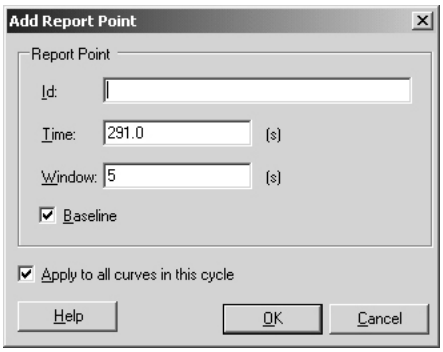


↓

マウスのカーソル（矢印）をリファレンスラインの縦線に合わせ、クリック後に任意の時間までドラッグする。または、任意の時間上のセンサーグラムをクリックし、リファレンスラインを移動する。

↓

ツールバーの **Add Report point** アイコン（ ）またはメニューバーの **Edit** → **Report point** の **Add** をクリックする。

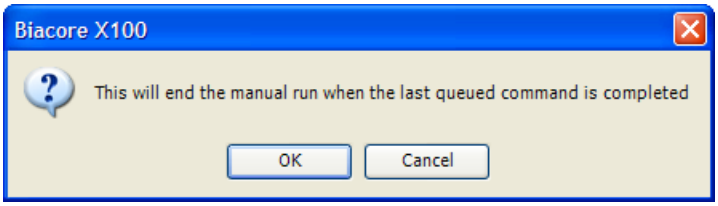


Id:　　レポートポイント名

Baseline ;　　相対値 0（ベースライン）に設定する場合はチェックを入れる。

2-1-3. 測定の終了

サンプル添加終了後、**End manual run** アイコン( )またはメニューバーの **Run** → **Stop Run...**をクリックする。



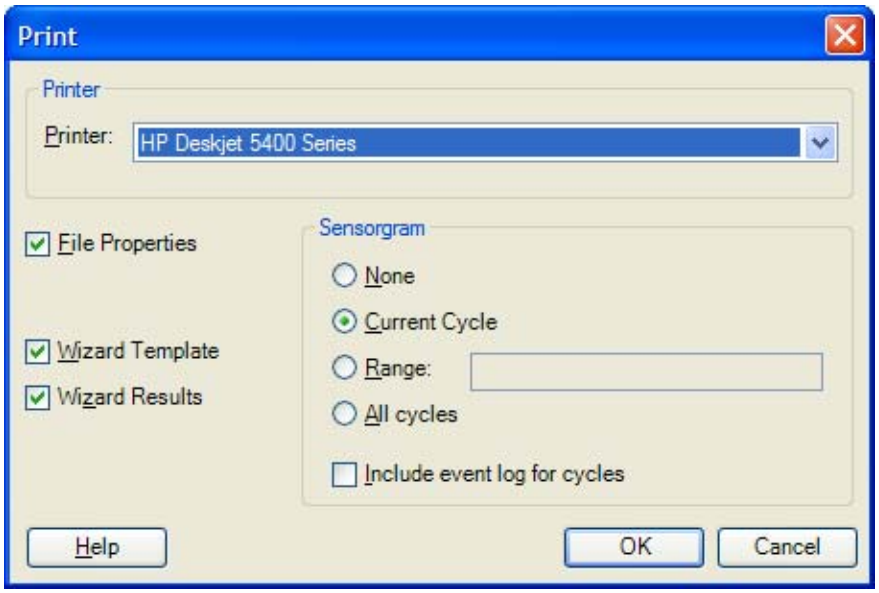
OK をクリックする。指定したコマンドを全て実行した後に、自動的に **Standby** 状態になる。

2-2. ファイルの保存

得られたセンサーグラムは測定終了時に自動保存される。
追加したレポートポイントを上書き保存するには、メニューバーの **File** → **Save** を実行する。

2-3. データの印刷

File → **Print...**をクリックする。



印刷したい項目にチェックを入れ、OK をクリックする。

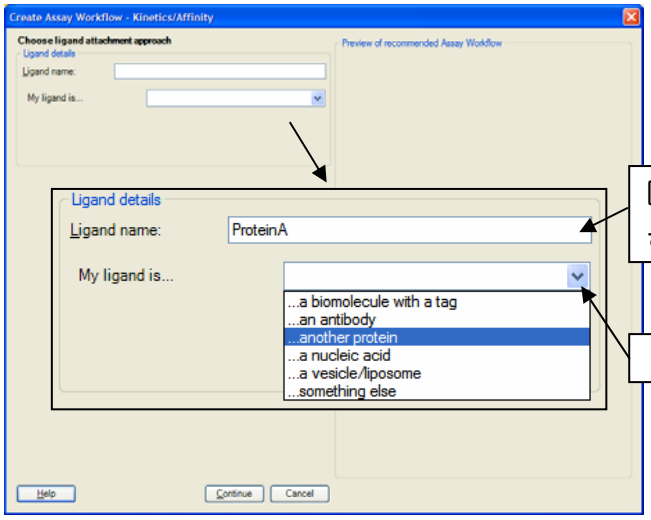
File Properties	ファイルプロパティを印刷
Wizard Template	測定内容を印刷
Wizard Results	測定結果を印刷
Sensorgram	
None	センサーグラムの印刷なし
Current Cycle	表示されているセンサーグラムを印刷
Range	複数サイクル存在する場合に必要なセンサーグラムを印刷
All cycles	すべてのセンサーグラムを印刷
Include event log for cycles	イベントログを印刷

3. 反応速度定数・解離定数の算出

3-1. ワークフローの作成

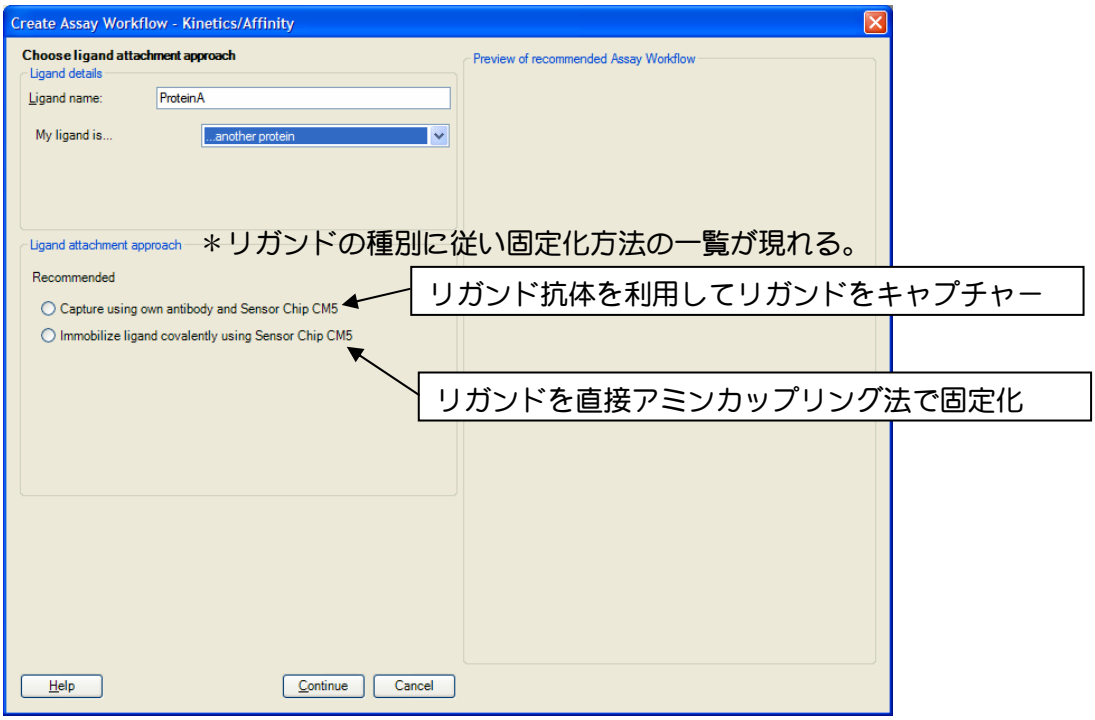
Create Assay Workflow の、 **Kinetics/Affinity...**を選択する。

↓



Kinetics/Affinity のダイアログが表示される。
上記項目を入力する。

↓



補足 3-1. キャプチャー法によるリガンドの固定化

リガンドを、予めチップ上に固定化したキャプチャー分子によって、サイクル毎にセンサーチップ上に補足させる方法をキャプチャー法と呼ぶ。

ワークフロー作成の、"Ligand details"の"My ligand is..."で、以下のリガンドの種別を選択すると、"Ligand attachement approach"に推奨する固定化方法が表示される。

・...a biomolecule with a tag

My ligand is tagged with... （リガンドのタグ名）	推奨固定化法
...biotin	・Sensor Chip SA に固定化
...GST	・抗 GST 抗体によるキャプチャー （GST capture kit, BR-1002-23 ）
...his	・Sensor Chip NTA に固定化
...another tag	・抗タグ抗体によるキャプチャー ・直接固定化

・...an antibody

My antibody is ...（抗体の種別）	推奨固定化法
...a mouse antibody	・抗マウス抗体によるキャプチャー （ Mouse Antibody Capture Kit, BR-1008-38 ）
...a human antibody	・抗ヒト抗体によるキャプチャー （ Human Antibody Capture Kit, BR-1008-39)
...another antibody	・抗体認識抗体によるキャプチャー ・直接固定化

・...another protein

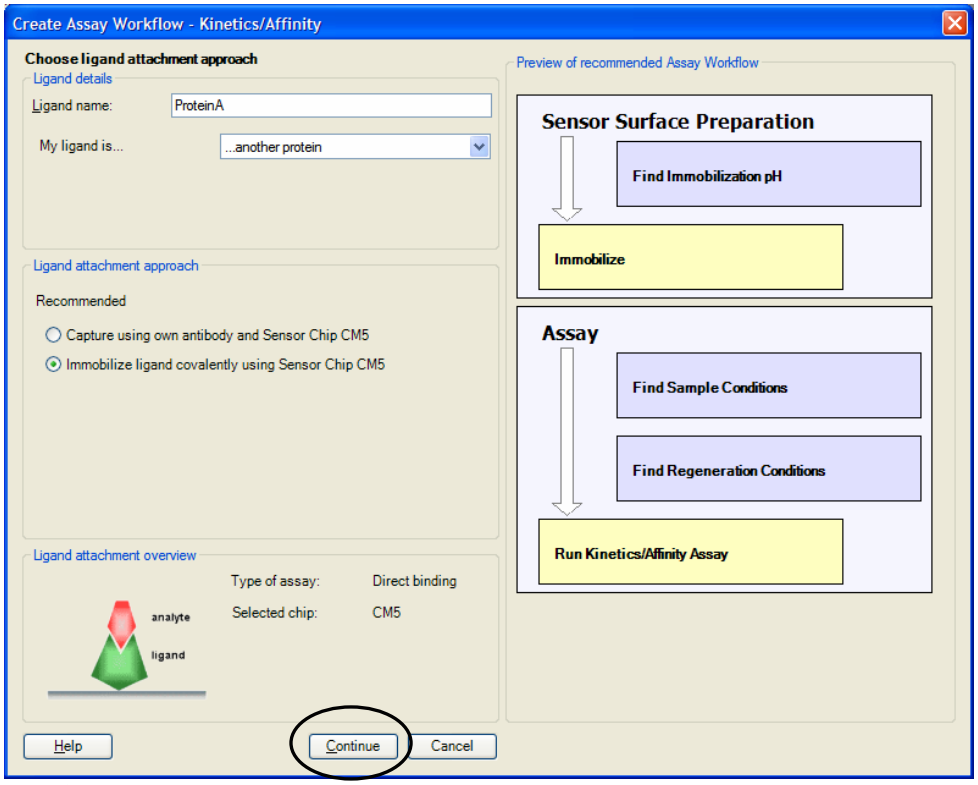
リガンド認識抗体によるキャプチャーまたは直接固定化

キャプチャーキットを利用する場合には、キャプチャー分子の固定化の条件検討の必要がない。添付説明書に従い、Immobilize ウィザードで固定化を行う。キャプチャーキット以外のキャプチャー分子の固定化を行う場合には、直接リガンドを固定化する場合と同様に条件検討が必要となる。

なお、キャプチャー分子は、フローセル 1 および 2 に固定化を行う。ウィザードでは、自動的にフローセル 1, 2 に固定化する設定となっている。

ここでは、**Immobilize ligand covalently using Sensor Chip CM5** を選択する。

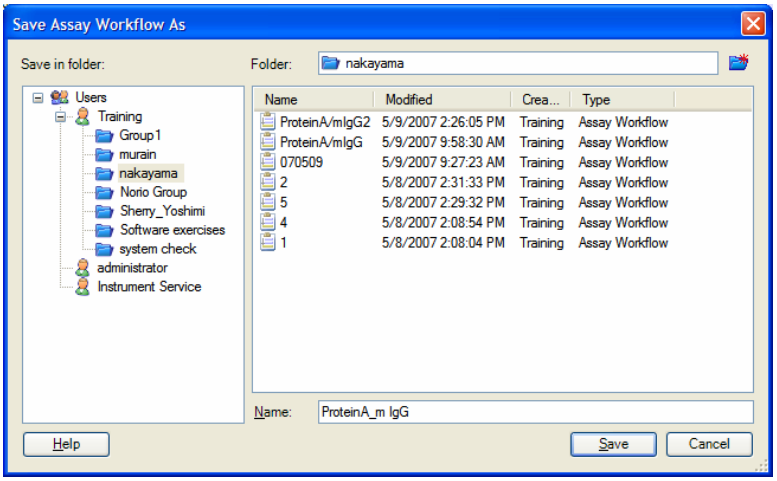
↓



ダイアログ左下に **Ligand attachment overview**、右側に **Preview of recommended Assay Workflow** が現れる。測定の流れを確認する。

Continue をクリックする。

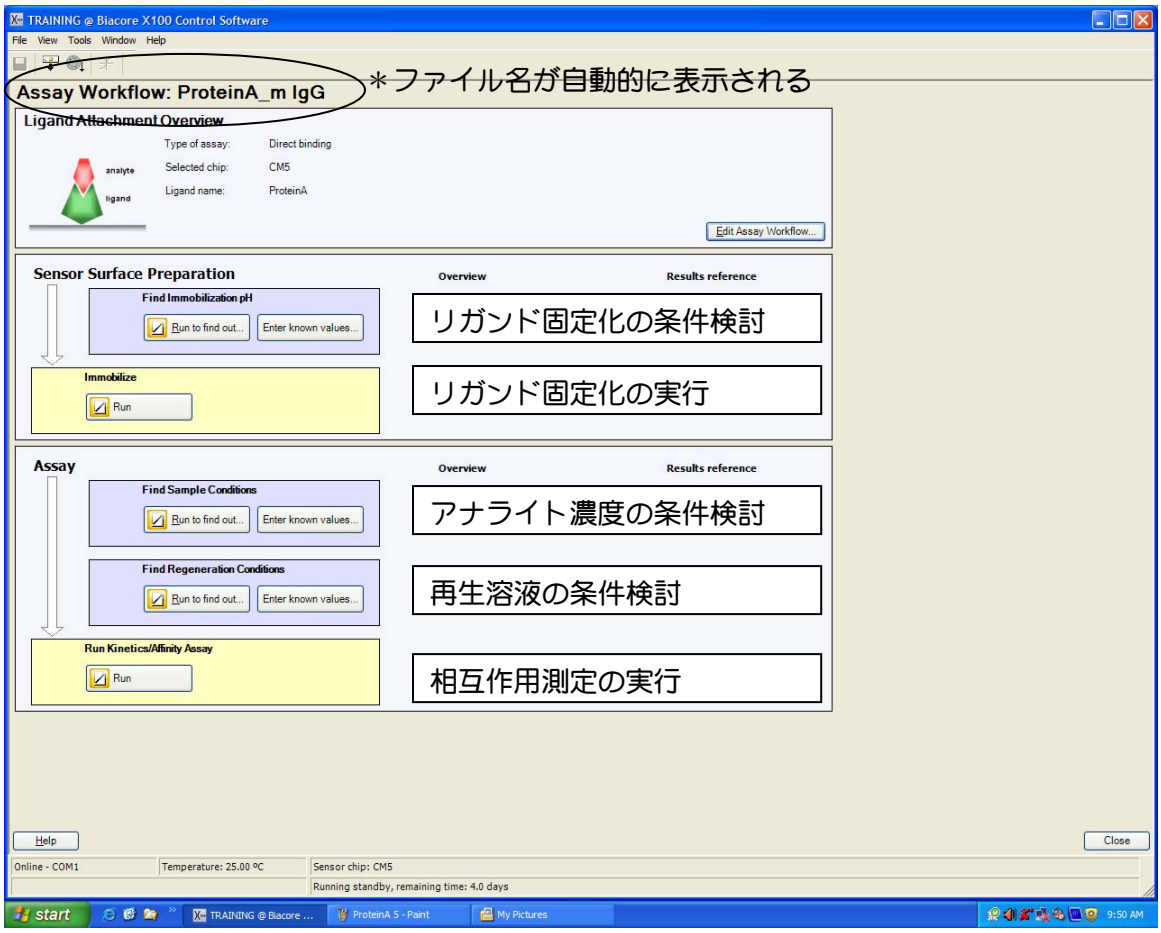
↓



作成したワークフローの保存先を指定する。

ワークフローを保存すると、その後、このワークフロー上で実施した測定条件や試験結果等を紐付けして記録される。**Save** をクリックする。

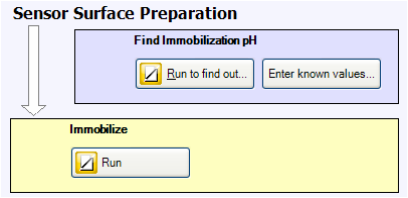
↓



すべてのステップにおいて、**Run to find out...**もしくは **Run** から、対応するウィザードを呼び出して実行する。得られた結果は、**Overview** に表示され、**Results reference** からデータを見ることが出来る。条件検討のステップで、すでに条件が分かっている場合は、**Enter known values...**から条件を入力すると、**Overview** に表示される。

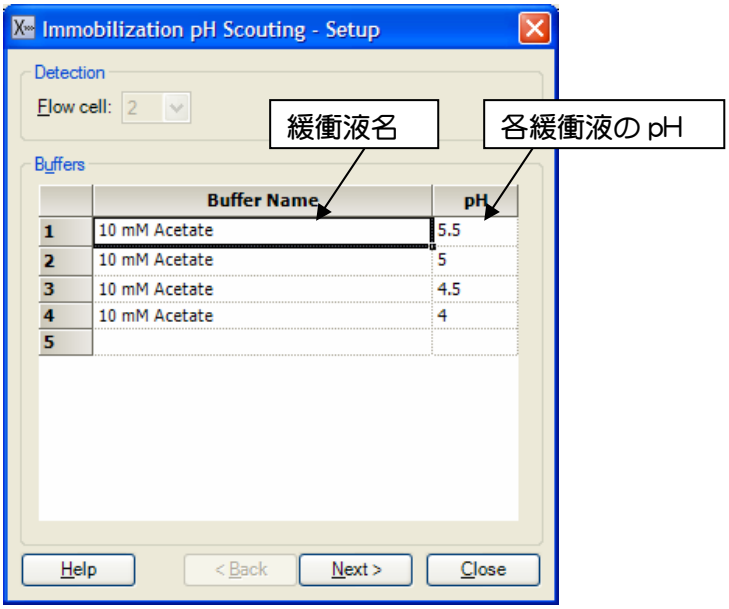
3-2. リガンド希釈液の pH 選択の実行

リガンド希釈液の pH 選択方法の詳細については、C-2.（VI ページ）を参照。
ワークフローの **Sensor Surface Preparation** のウィザードを実行する。



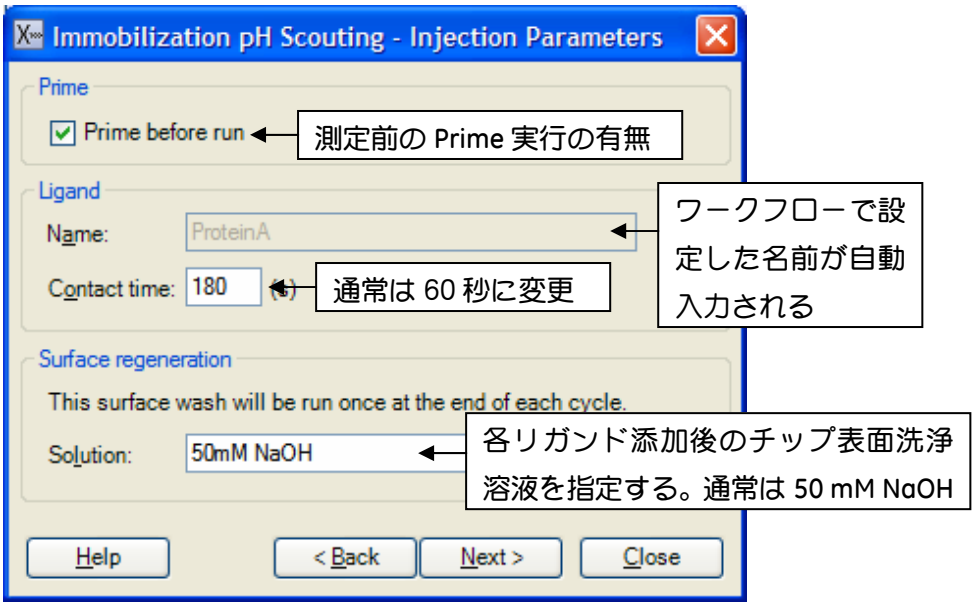
↓

Find Immobilization pH の **Run to find out...**をクリックする。（既に固定化緩衝液が決まっている場合には、**Enter known values...**をクリックして、条件を入力する。）



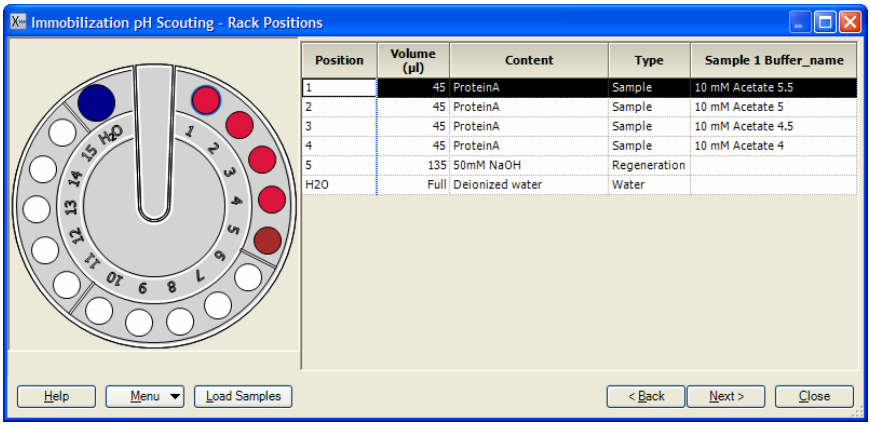
Next>をクリックする。

↓



Next>をクリックする。

↓



Rack Positions ダイアログが表示される。テーブルに従いサンプルをラックにセットする。
Next>をクリックする。

↓

確認画面が表示される。確認後、**Start** をクリックする。

↓

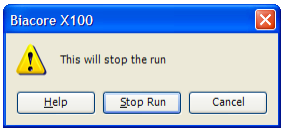
結果の保存先とファイル名を指定後、**Save** をクリックする。緊急停止をする場合は、補足 3-2.（30 ページ）を参照。

↓

補足 3-2. 測定の緊急停止

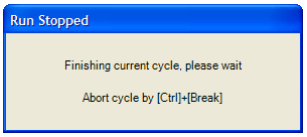
測定中に緊急停止させる場合、ツールバーの **Run** → **Stop Run...**をクリックする。

↓



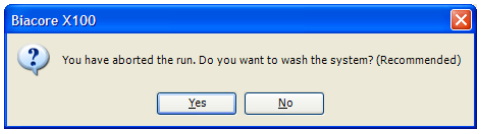
Stop Run をクリックする。

↓

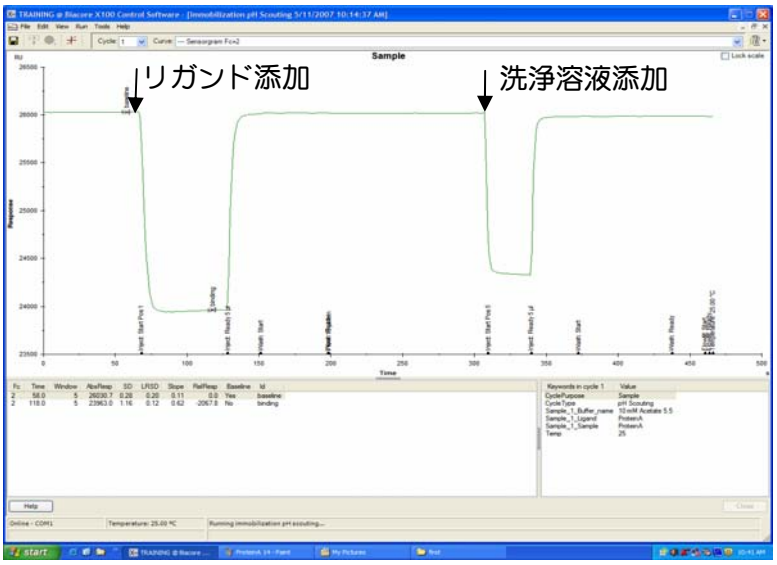


測定中サイクルの全コマンドを実行後、**Standby** 状態になる。
全コマンド実行を待たずに測定を中止したい場合には、キーボードの “Ctrl” キーと “Break” キーを同時に押す。

↓



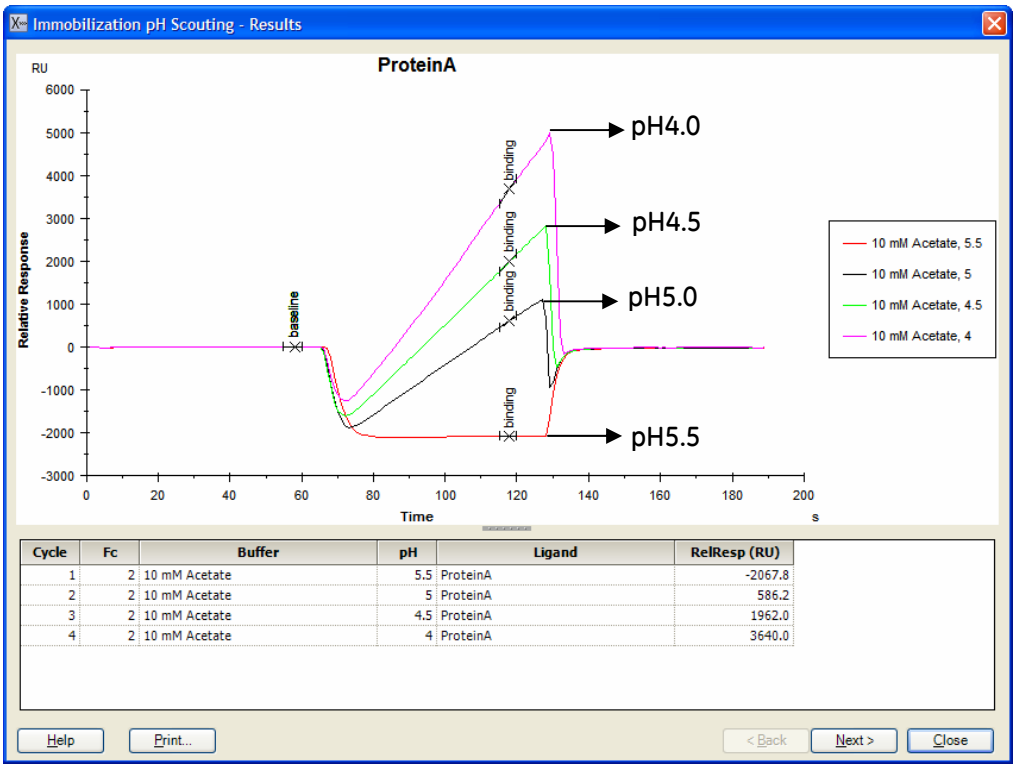
装置の洗浄を行う場合には、**Yes** をクリックする。洗浄後停止する。



上記サイクルを 1 サイクルとして、指定した緩衝液の測定を行う。

↓

測定が終了すると、**Results** ダイアログが現れる。



Cycle	Fc	Buffer	pH	Ligand	RelResp (RU)
1	2	10 mM Acetate	5.5	ProteinA	-2067.8
2	2	10 mM Acetate	5	ProteinA	586.2
3	2	10 mM Acetate	4.5	ProteinA	1962.0
4	2	10 mM Acetate	4	ProteinA	3640.0

各緩衝液添加時のセンサーグラムが重ね書きで表示される。プレコンセントレーション効果が確認できる最も高い pH 条件で固定化を行う。(上記の場合、pH5.0 を採用する。)

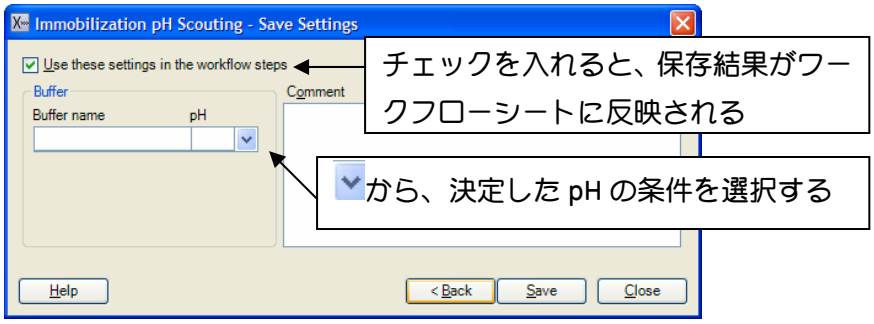
補足 3-3. リガンド希釈液の pH の選択方法

濃縮効果が確認できる最も高い pH を固定化条件として採用する。
上記結果では、pH4 が最も濃縮効果が高いが、pH が低いほど、活性型 NHS 基とアミノ基とのカップリング効率は低下する（活性化 NHS 基とアミノ基の至適反応条件は pH8.5）。また、タンパク質の安定性は一般的に中性に近い程安定である。pH を変化させても、濃縮効果（添加時の傾き）に極端な差がない場合は、pH が高い条件を選択するのが望ましい。
上記結果では、pH5 を選択する。
なお、**Immobilization pH Scouting** における濃縮レベル以上の固定化は困難である。確認した濃縮レベル（RU）よりもっと多くの固定化量を望む場合は、リガンド濃度を上げて（例 100ug/ml 等）、再度 **Immobilization pH Scouting** を実施し濃縮レベルを確認する。
濃縮効果が確認できる最も高い pH を固定化条件として採用する。

Next>をクリックする。

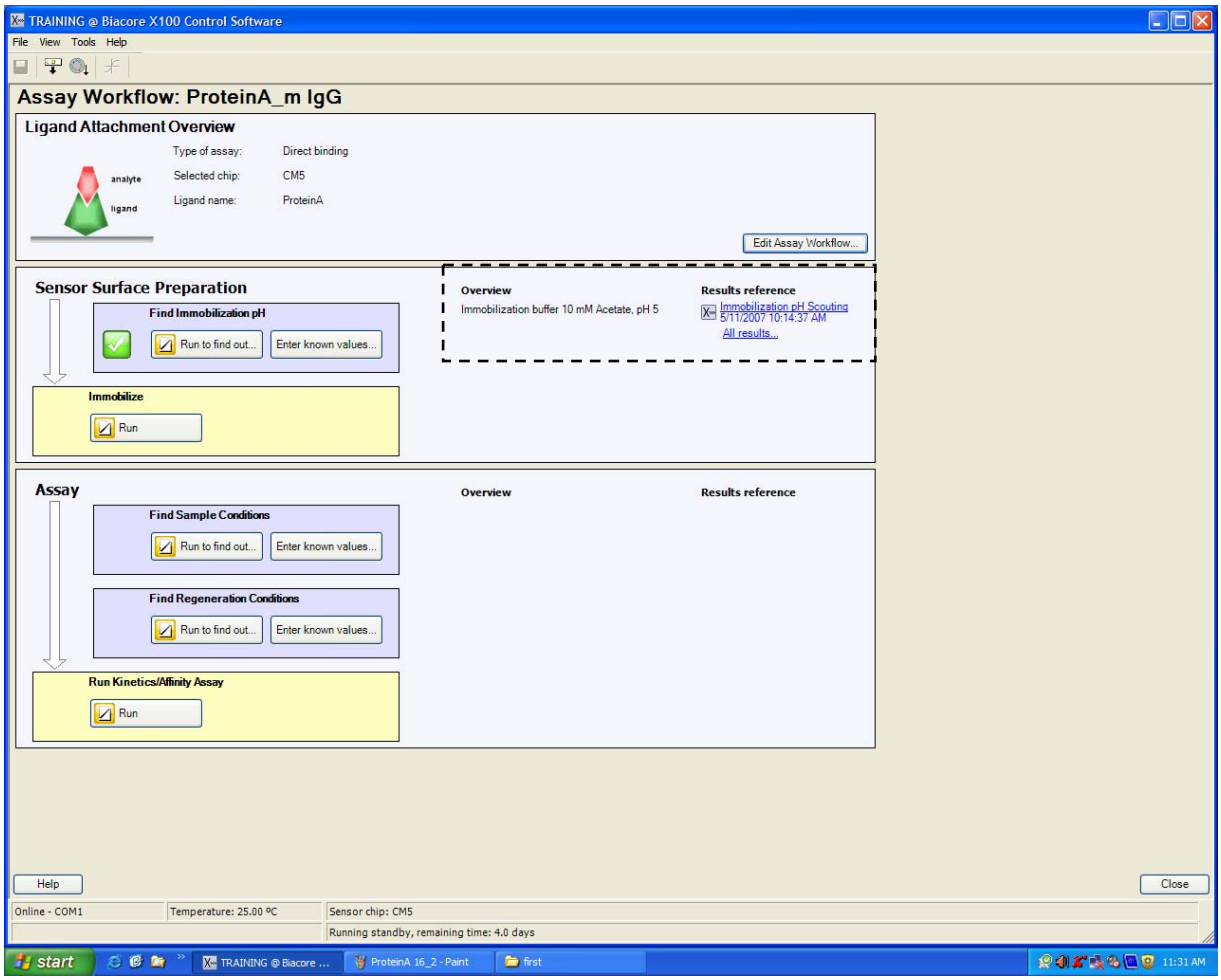
↓

Save Settings ダイアログが表示される。



Save をクリックする。

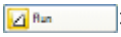
↓



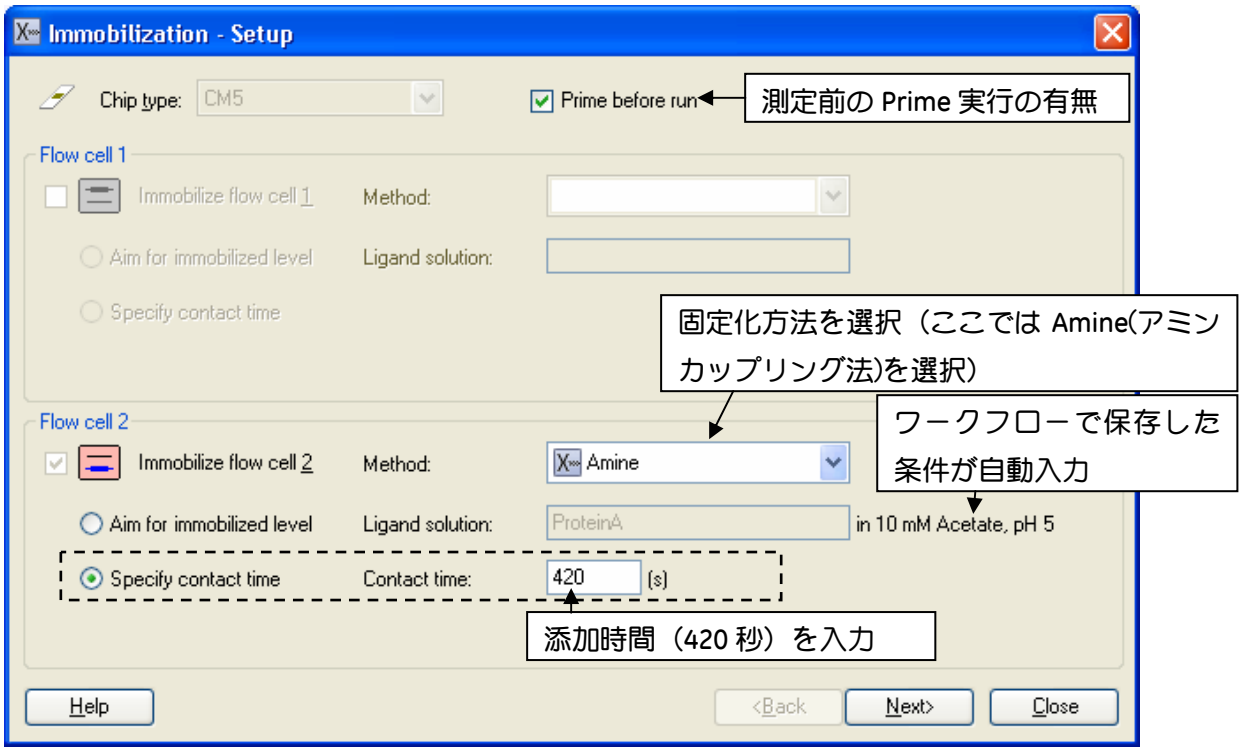
条件検討が終了すると、ワークフローシートの、**Find Immobilization pH** に（ ✅ ）が入る。**Overview** にリガンドの調製条件が表示され、**Results reference** で、**Find Immobilization pH** で実行した測定結果ファイルが表示される。ファイル名をクリックすると、測定結果ファイルを開くことができる。複数のファイルがある場合には、**All results...** をクリックし、ファイルの確認を行う。

3-3. 固定化の実行

固定化の詳細については、C（II ページ）を参照。

Immobilize の  をクリックする。

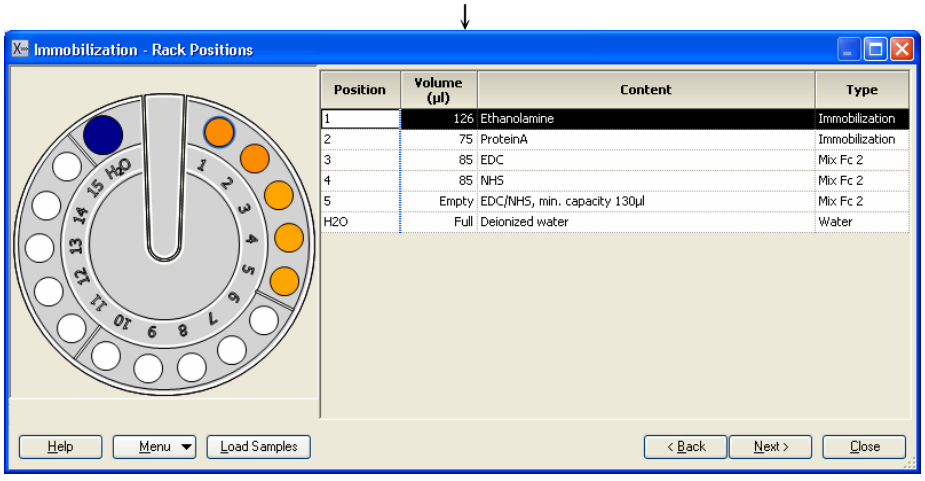
↓



ワークフローで実施する固定化は、フローセル 1 がリファレンスセル、フローセル 2 がリガンド固定化セルと設定されている。活性化およびブロッキング時間は 7 分間である。

Next>をクリックする。

↓



Rack Positions ダイアログが表示される。テーブルに従い必要サンプルをラックにセットする。

Ethanolamine	126 µl/ 11 mm プラスチックバイアル
Ligand	75 µl/ 11 mm プラスチックバイアル
EDC	85 µl/ 11 mm プラスチックバイアル
NHS	85 µl/ 11 mm プラスチックバイアル
空（NHS/EDC 混合用）	空/ 11 mm プラスチックバイアル

固定化時間・流速を変更した場合には必要量が変わる。

EDC と NHS を自動等量混合するための、空バイアルもセットする。

Next>をクリックする。

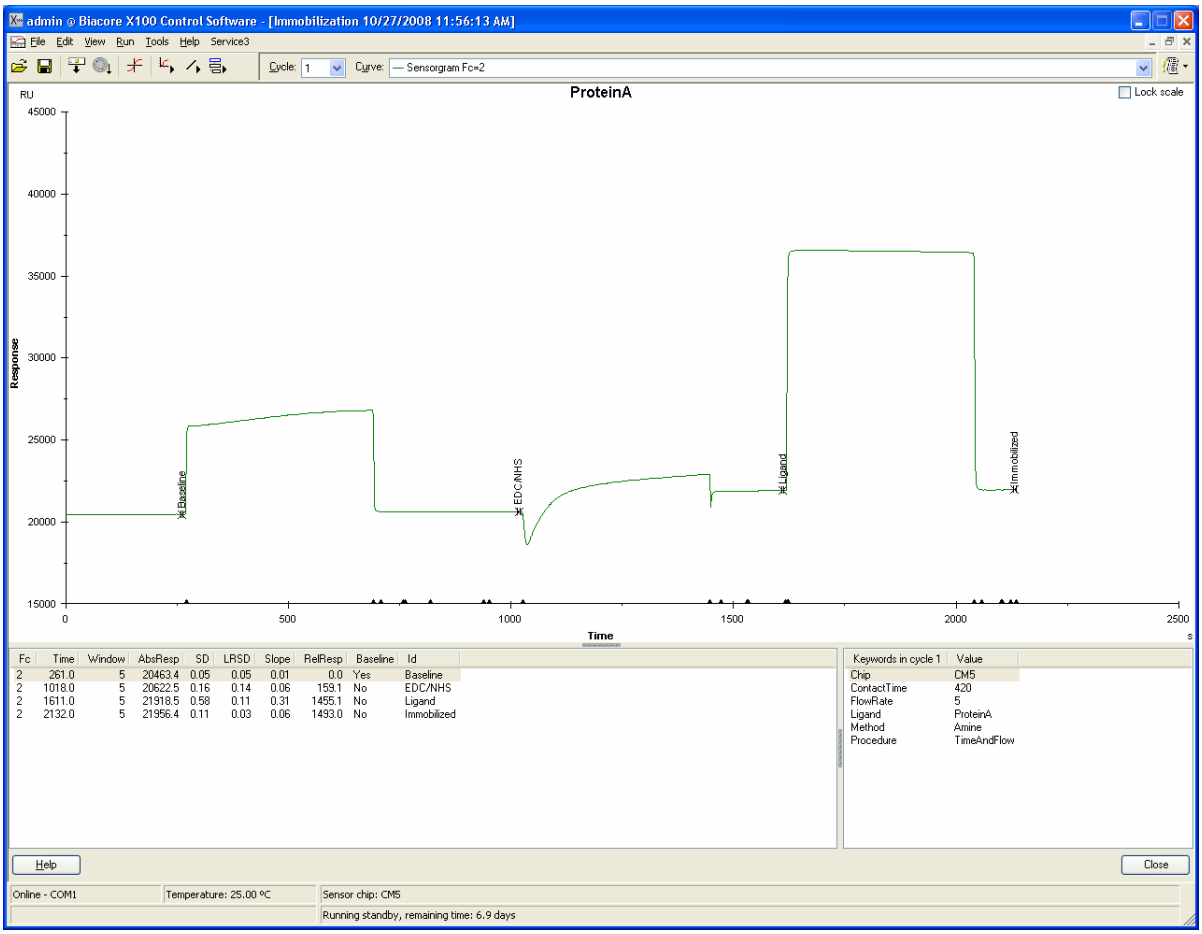
↓

確認画面が表示される。確認後、**Start** をクリックする。

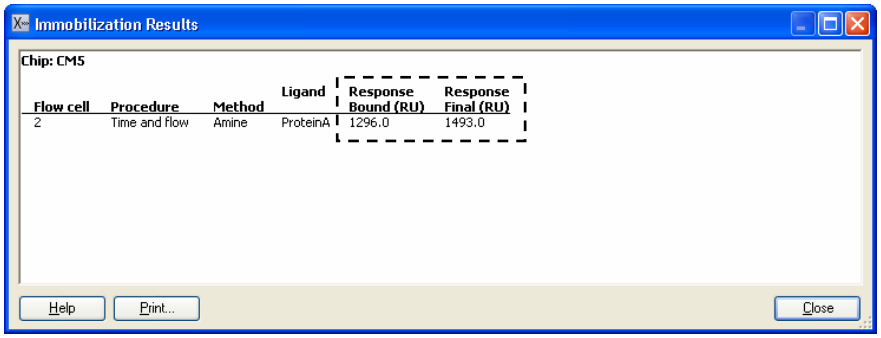
↓

結果の保存先とファイル名を指定後、**Save** をクリックする。測定を緊急停止したい場合は、Ctrl キーと Break キーを同時に押す。補足 3-2.（30 ページ）を参照。

↓



固定化が終了すると装置は **Standby** 状態になる。測定データは入力したファイル名で自動保存される。**Immobilization Results** ダイアログが表示される。

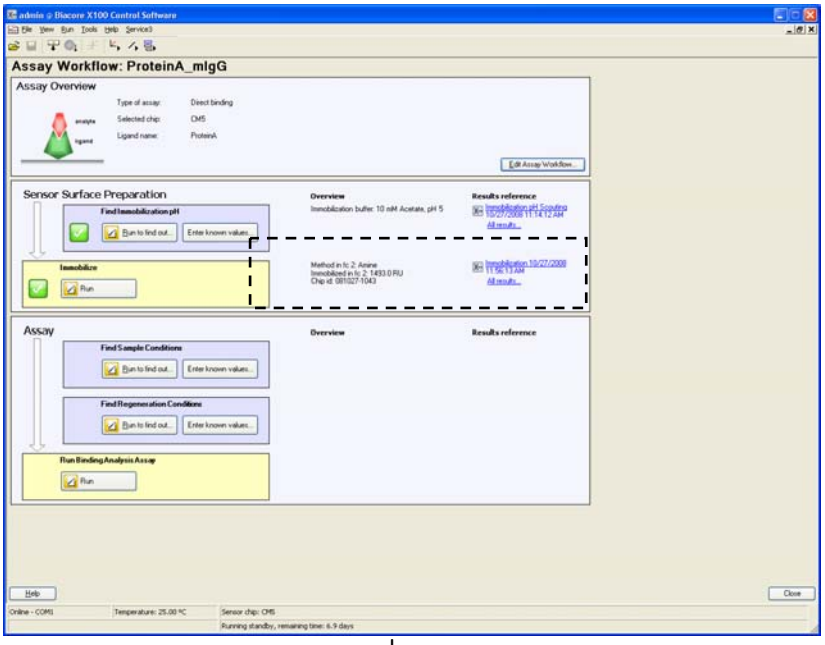


固定化量（**Response Bound** と **Response Final**）（**RU**）が表示される。

補足 3-4. 固定化量の評価

固定化量として **Response Bound** と **Final** の 2 種類が表示される。**Bound** は、リガンド添加前後のセンサーグラムの高さの差、**Final** は、NHS/EDC 添加前からエタノールアミン添加終了後の差である。リガンドがアグリゲーションしている場合やセンサーチップ表面に吸着する場合は、エタノールアミンを添加することにより、非共有結合でセンサーチップ表面に残ったリガンドは洗い流されるため、**Final** のレスポンスは **Bound** より小さくなる。また、極めて固定化量が少ない場合は、NHS 化した部分の大半に（一部はリガンドが導入されている）エタノールアミンが導入されるため、**Final** のレスポンスは **Bound** より大きくなることがある。いずれの場合も、レスポンスが小さい方を固定化量として採用する。

Immobilization Result ダイアログの **Close** をクリックする。センサーグラム右下の **Close** をクリックする。



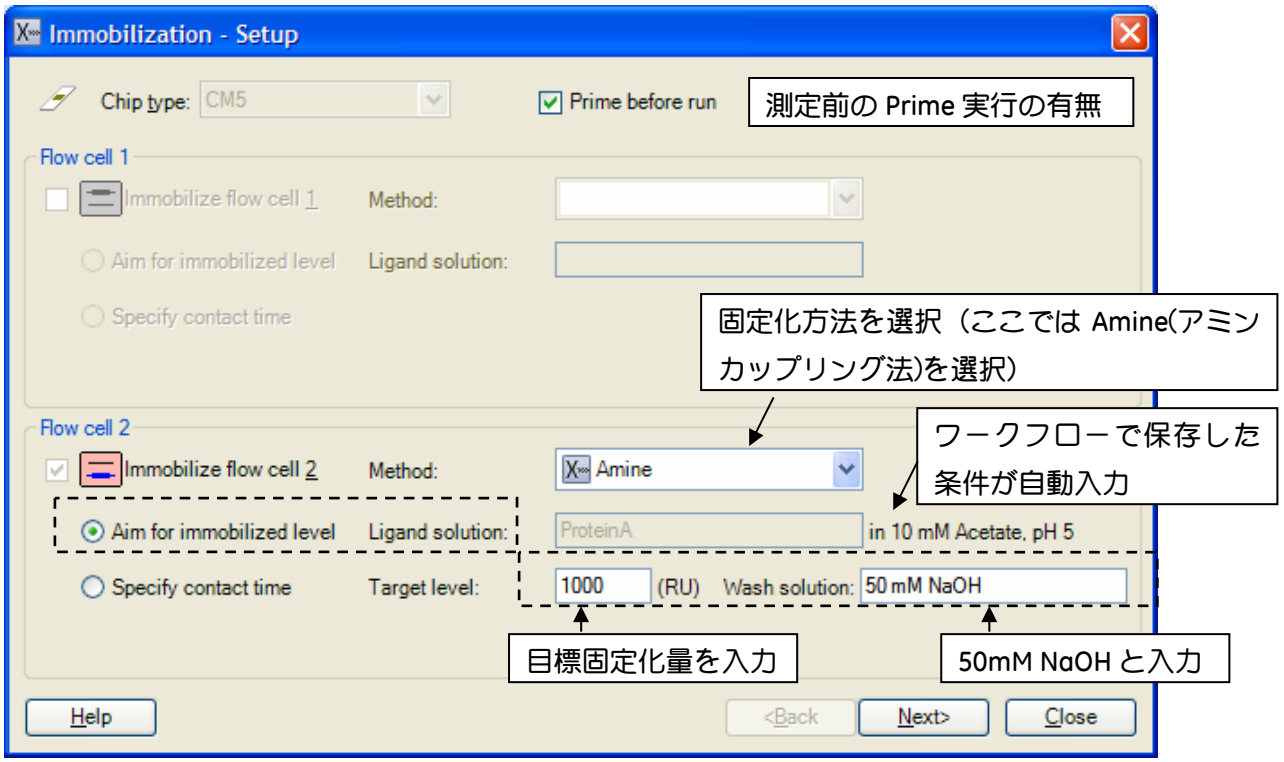
↓

ワークフローシートの、**Immobilize** に（✅）が入る。**Overview** にリガンドの固定化方法、固定化量等が表示される。**Results reference** に、固定化の結果ファイルが表示される。

（目標固定化量に自動調整する場合）

Immobilize の **Run** をクリックする。

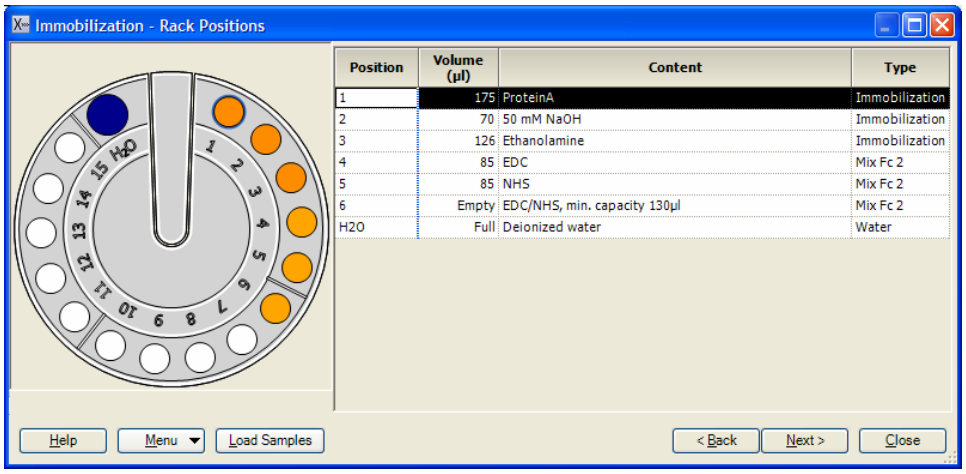
↓



ワークフローで実施する固定化は、フローセル 1 がリファレンスセル、フローセル 2 がリガンド固定化セルと設定されている。活性化およびブロッキング時間は 7 分間である。

Next>をクリックする。

↓



Rack Positions ダイアログが表示される。テーブルに従い必要サンプルをラックにセットする。

Ligand	175 µl/ 11 mm プラスチックバイアル
50mM NaOH	70 µl/ 11 mm プラスチックバイアル
Ethanolamine	126 µl/ 11 mm プラスチックバイアル
EDC	85 µl/ 11 mm プラスチックバイアル
NHS	85 µl/ 11 mm プラスチックバイアル
空（NHS/EDC 混合用）	空/ 11 mm プラスチックバイアル

流速を変更した場合には必要量が変わる。

EDC と NHS を自動等量混合するための、空バイアルもセットする。

Next>をクリックする。

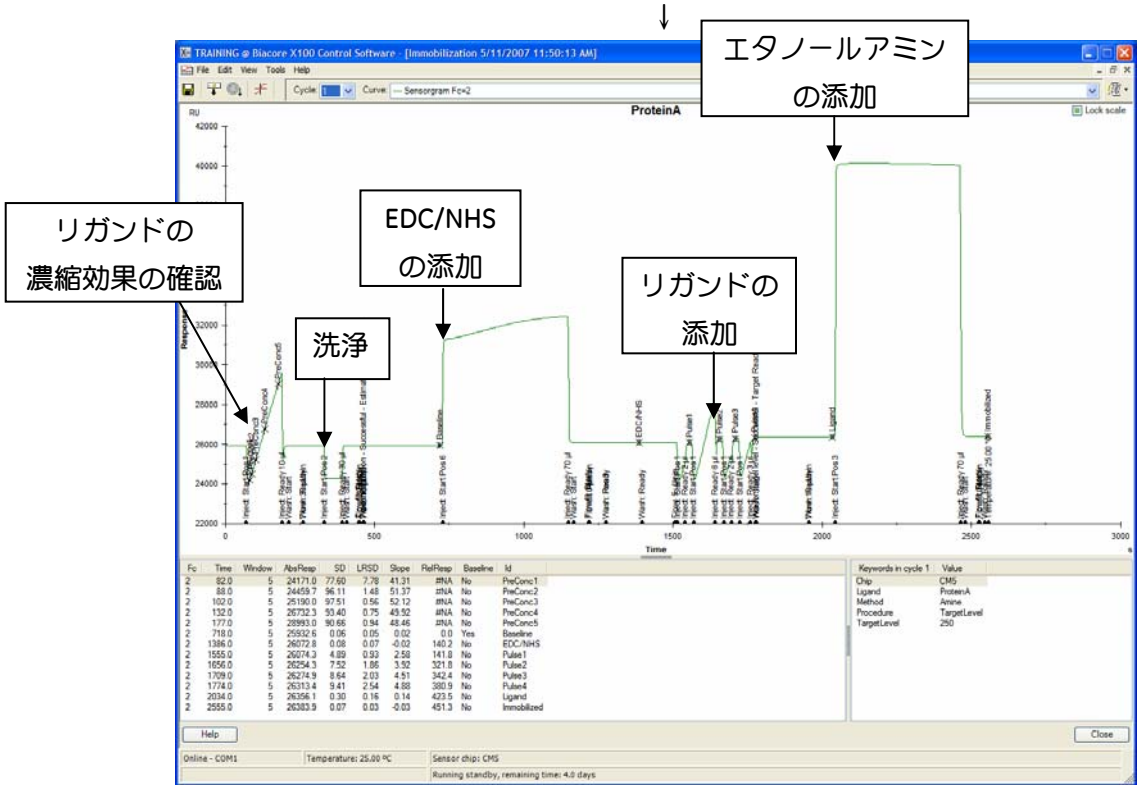
↓

確認画面が表示される。確認後、**Start** をクリックする。

↓

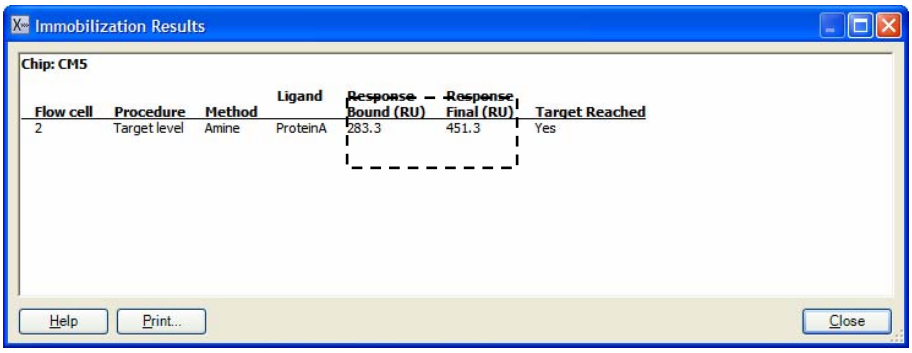
結果の保存先とファイル名を指定後、**Save** をクリックする。測定を緊急停止したい場合は、Ctrl キーと Break キーを同時に押す。補足 3-2.（30 ページ）を参照。

↓



注意）**Aim for immobilized level** を選択すると、固定化の前に、リガンドの濃縮効果の確認とチップ表面の洗浄を行う。

固定化が終了すると装置は **Standby** 状態になる。測定データは入力したファイル名で自動保存される。**Immobilization Results** ダイアログが表示される。

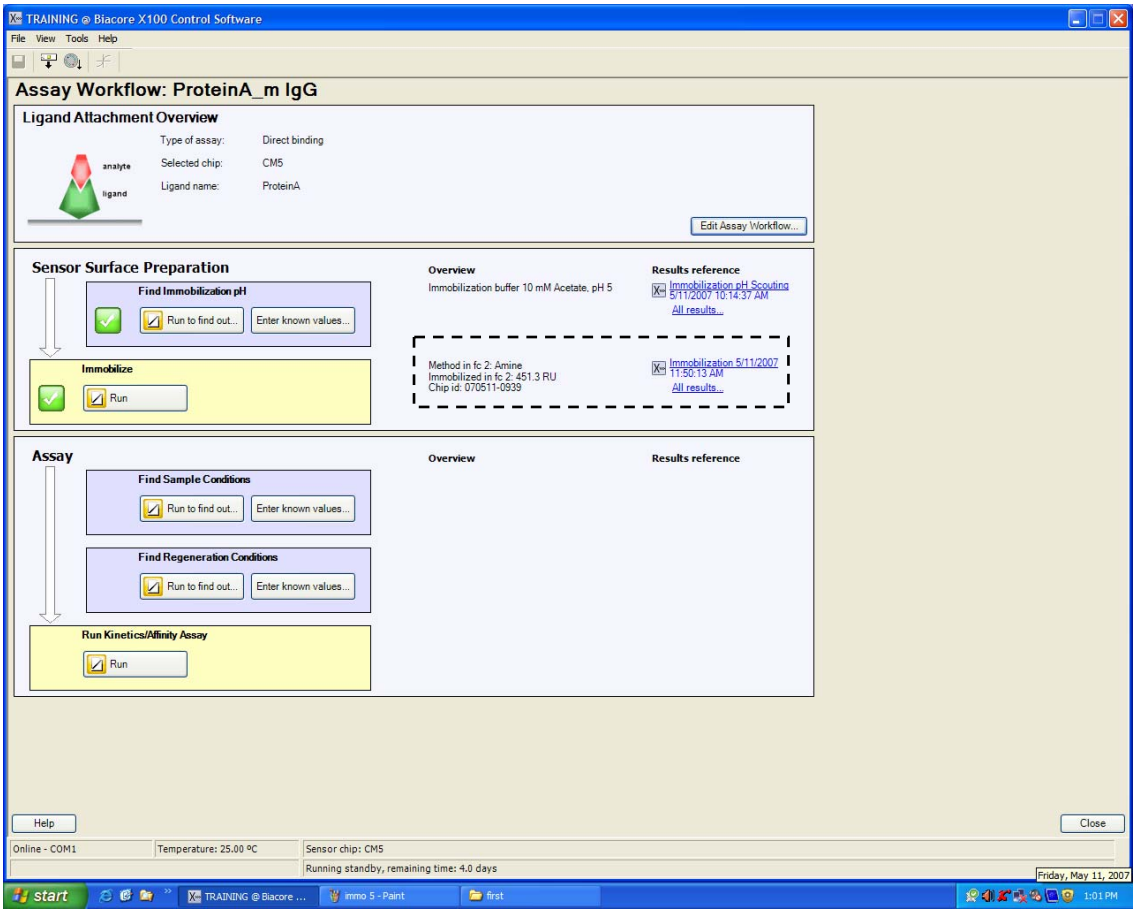


固定化量（**Response Bound** と **Response Final**）（RU）が表示される。固定化量の評価については、補足 3-4.（36 ページ）を参照。

↓

Immobilization Result ダイアログの **Close** をクリックする。センサーグラム右下の **Close** をクリックする。

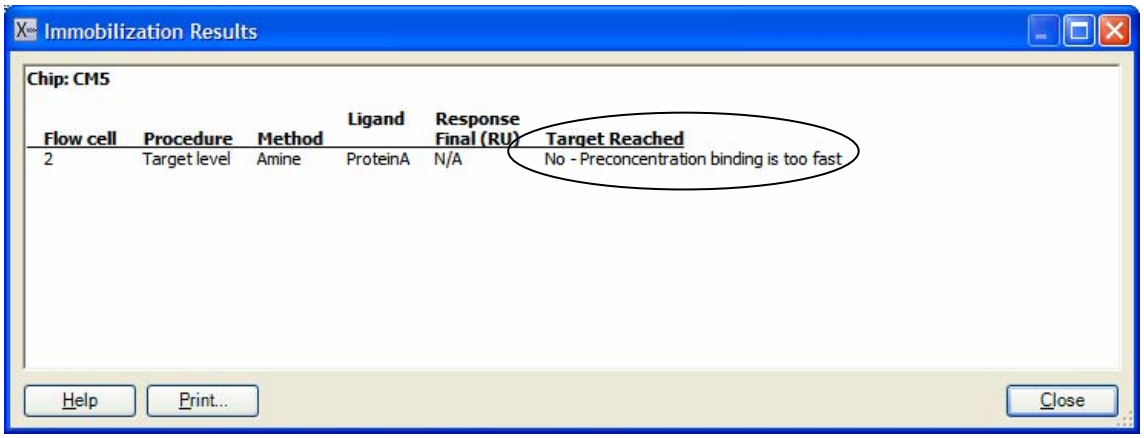
↓



ワークフローシートの、**Immobilize** に（ ✅ ）が入る。**Overview** にリガンドの固定化方法、固定化量等が表示される。**Results reference** に、固定化の結果ファイルが表示される。

補足 3-5. 固定化実行中の中断

Aim for immobilized level を実行すると、NHS 活性化前に、リガンド溶液をフローセルにテスト添加する。濃縮効果が得られるかどうか、その結果から目的の固定化量に調整できるリガンド溶液の状態であるかを判断する。
セットしたリガンド溶液に問題がある場合には、この時点でプログラムが自動的に終了する。この場合、フローセルにはリガンドは固定化されていないので、リガンド溶液を調製しなおして、同じフローセルに再度固定化を試みる。



・濃縮効果が強すぎる場合　（Preconcentration binding is too fast）
テスト添加において濃縮効果が強すぎて、添加時間を短くしても目標のレベル以上に固定化されてしまうと判断された場合は、Target Reached に Preconcentration binding is too fast とメッセージが表示され、固定化操作が中断される。

この場合には、希釈緩衝液の pH を上げるか、リガンド濃度を下げることにより、濃縮効果を下げて再度固定化し直す。

・濃縮効果が不十分な場合　（Preconcentration binding is too slow）
テスト添加においてリガンド溶液の濃縮効果が観察されなかった場合、もしくはあまりにも濃縮がゆるやかなため、添加時間を長くしても目標のレベルまで固定化できそうもないと判断された場合は、Target Reached に Preconcentration binding is too slow のメッセージが表示され、固定化が中断される。

この場合には、希釈緩衝液の pH を下げるか、リガンド濃度を上げることにより、濃縮効果を上げて再度固定化し直す。

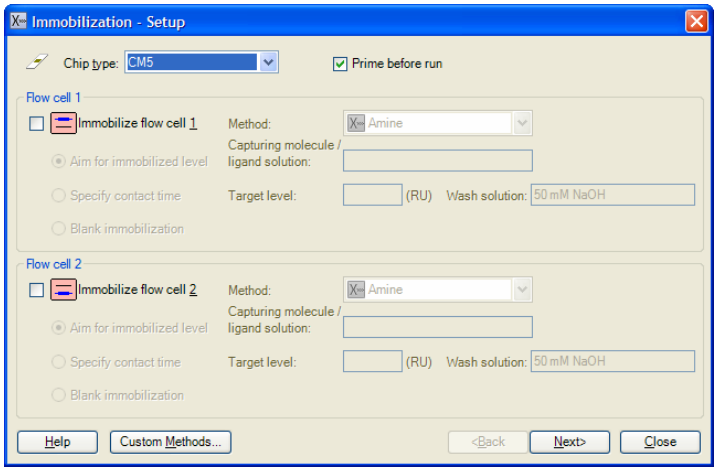
補足 3-6. 固定化テンプレートの変更

固定化の流速や活性化時間の変更を行う際や、フローセル 1 への固定化やブロッキングを行う時には、ワークフローを閉じ、**Wizards...** → **Immobilization** を実行する。

Other options の（　）をクリックする。

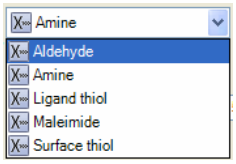
Wizards... → **Immobilization** をクリックする。**New** をクリックする。

↓



Chip type を選択し、固定化を行うフローセルを選択する。

Method:のプルダウンメニューをクリックして選択する。



リガンド添加方法を選択する。

〇Aim for immobilized level　Target level にターゲット固定化量を入力する。自動で固定化量を調整する。

Wash solution:　固定化前に実施する濃縮効果確認後の、チップ表面の洗浄溶液を指定する。通常は、50mM NaOH を指定する。（固定化前の洗浄なので、リガンドへの影響はない。）

〇Specify contact time　入力した時間リガンドを添加。

〇Blank immobilization　活性化・ブロッキングのみ行う。

↓

Next>をクリックする。

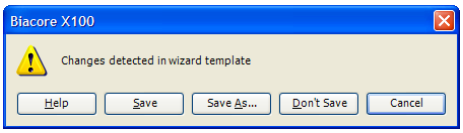
↓

Rack Position ダイアログが表示される。テーブルに従いサンプルをラックにセットする。**Next>**をクリックする。

↓

確認後、**Start** をクリックする。

↓



作成したテンプレートを保存するか聞かれる。必要があれば、**Save As...**で名前を付けて保存を行う。保存しない場合は、**Don't Save** をクリックする。

↓

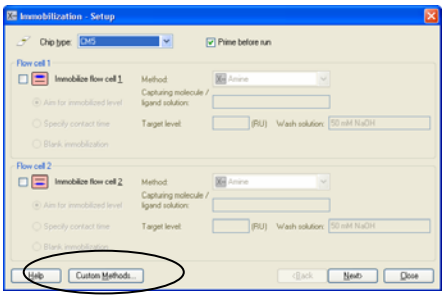
結果の保存先とファイル名を指定後、**Save** をクリックする。測定の緊急停止については、補足 3-2.（30 ページ）を参照。

↓

測定が終了すると、装置は **Standby** 状態になる。

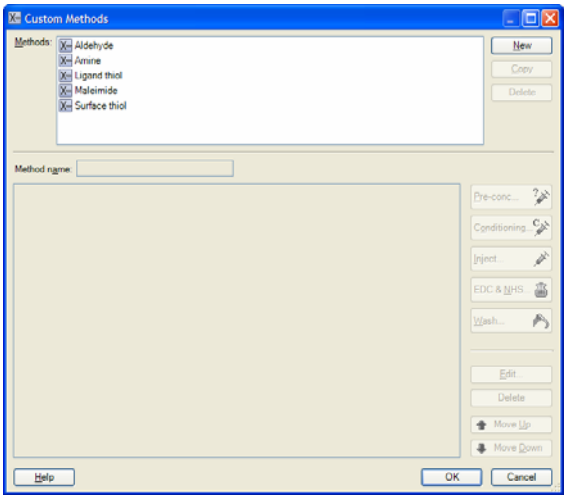
メソッドの変更とコマンドの追加

① メソッドの変更



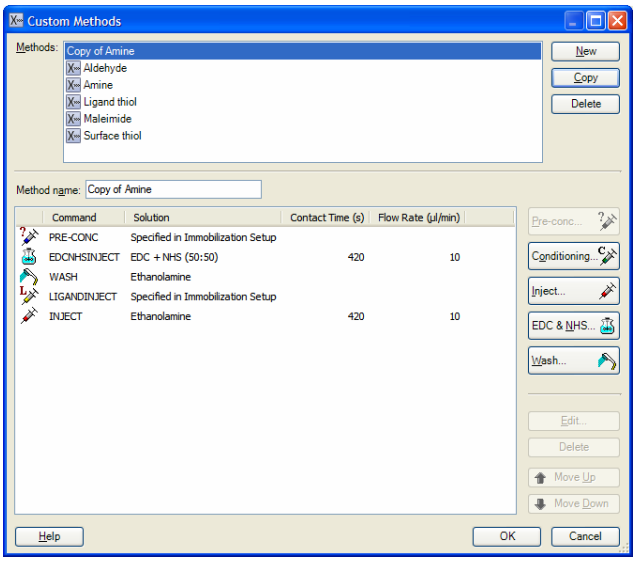
Setup ダイアログの **Custom Methods...**をクリックする。

↓



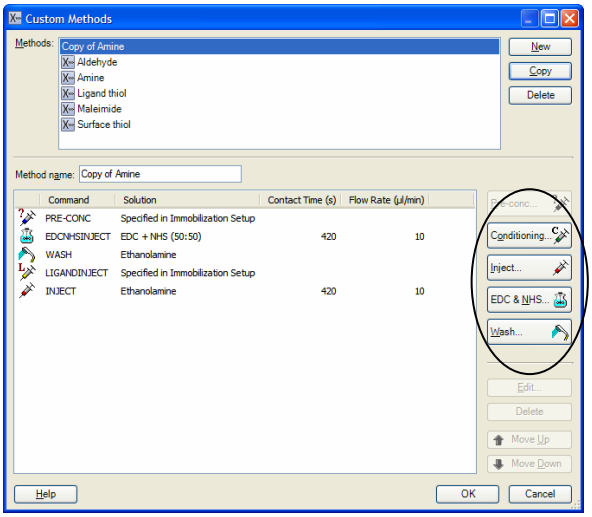
Methods:の各種固定化方法をクリックすると、テンプレートの固定化詳細が確認できる。
テンプレートの固定化条件を変更する際は、固定化方法を選択した状態で、**Copy** をクリックする。

↓



Method に追加される。**Method name** で名前の変更が可能。
コマンドをダブルクリックまたは選択後 **Edit...**をクリックすると、各種設定の変更が可能。

② コマンドの追加



ダイアログ右下のアイコンを選択して、コマンドを指定する。
OK をクリックする。

↓

変更および追加したメソッドは、**Set up** ダイアログの **Method：**で選択可能となる。

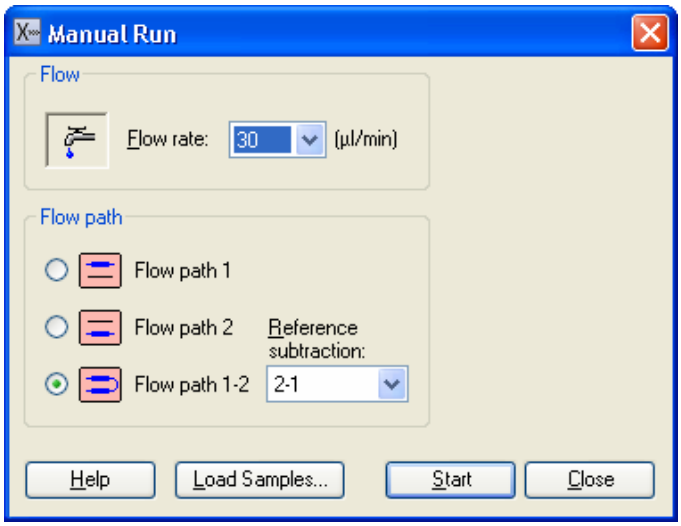
3-4. 特異的結合の確認および再生条件の検討

特異的結合の確認および再生条件の検討は、マニュアル測定でも、ワークフローからウィザードを使用した測定でも、両方対応できる。どちらかの測定方法を選択して条件検討を行う。

3-4-1. マニュアル測定による条件検討

マニュアル測定で条件検討する場合は、ワークフローは一旦閉じる。
Other options の（ ）をクリックし、 **Manual Run...**をクリックする。

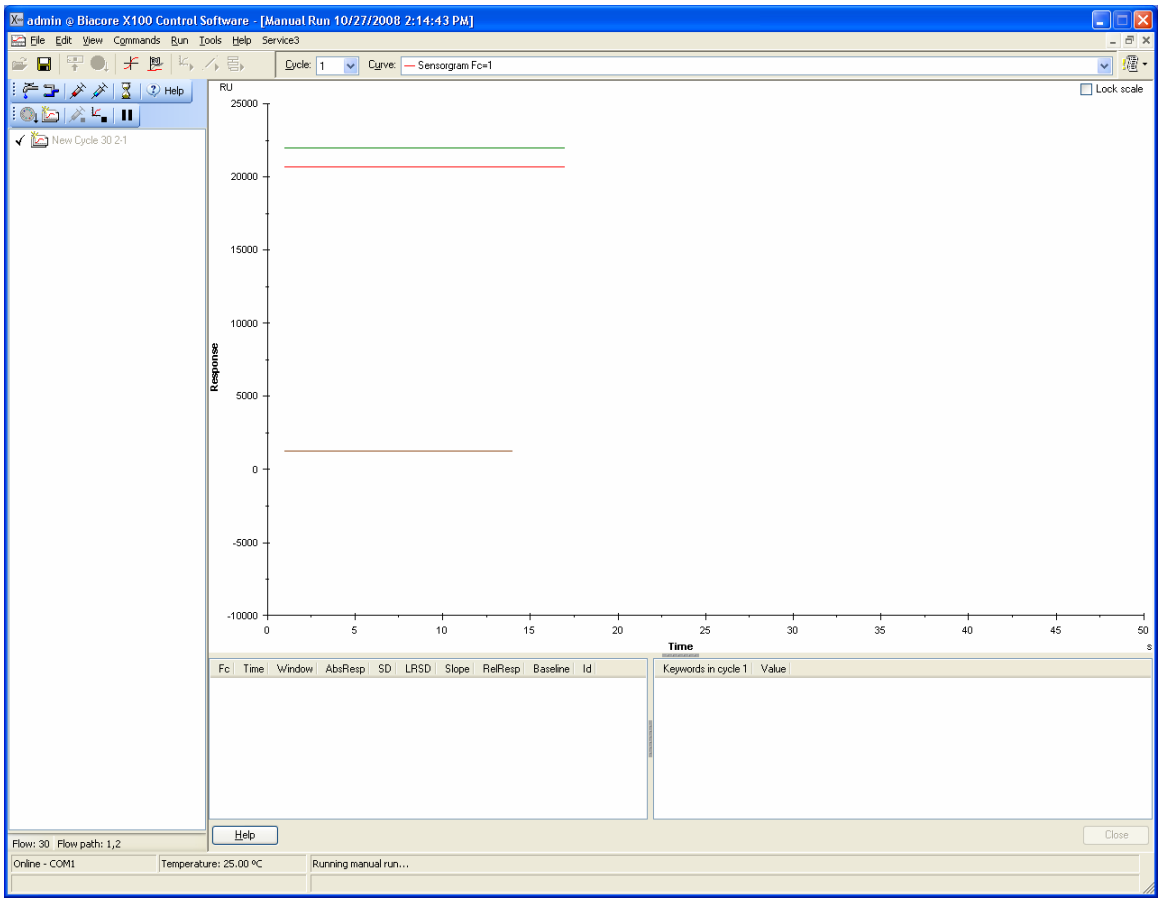
↓



流速は 30ul/min、Flow path は 1-2、Reference subtraction は 2-1 を設定する。
Start をクリックする。

↓

ファイル名を入力し、**Save** をクリックする。



フローセル 1 は赤、フローセル 2 は緑、2-1 の差し引きは茶色のセンサーグラムで表示される。

補足 3-7. センサーグラムの表示の変更

・1 本表示

View → Show Only Current Curve

右上のカーブリストから、表示するセンサーグラムを選択する。

・複数表示

View → Show All Curves

すべてのセンサーグラムを表示することができる。

・種別表示

View → Show Curves of Same Type

カーブリストから各フローセルのセンサーグラムもしくは差し引きセンサーグラムを選択できる。

補足 3-8. コマンドの説明

；流速の選択（流速 5、10、30 µl/min から選択）

；流路の切り替え（Detection1,2 に設定している場合利用可能）

；サンプル添加

；再生溶液添加

；待機（次の操作コマンドを実行するまでの時間を任意で設定できる）

；ヘルプボタン（Support Navigator を表示）

；サンプルラックの取り出し

；サイクルの切り替え。センサーグラムを新たにスタートする。

；添加の中止（サンプルおよび再生溶液添加時に実行可能）

；測定の終了（全てのコマンドの実行後に、自動で Standby 状態に入る）

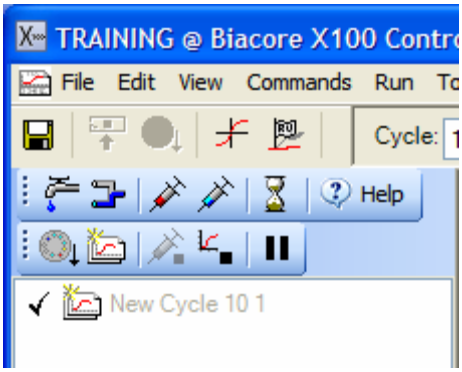
；一時停止（予約コマンドの一時停止が可能）

；再スタート（一時停止の解除）

コマンドは、コマンドテーブルに任意で追加が可能。追加されたコマンドは、上から順番に実行される。実行中のコマンドは、（ ）が付く。実行が終了したコマンドは、（ ✓ ）が付く。

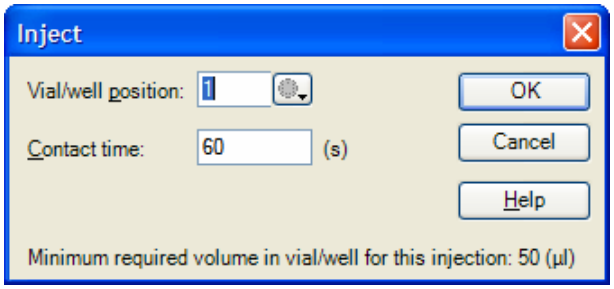
アナライトの添加

画面左上のアイコンを選択して、測定コマンドを指定する。(各コマンドの説明は補足 2-1. 参照。または、 Help をクリックしサポートナビゲーターを参照する。)



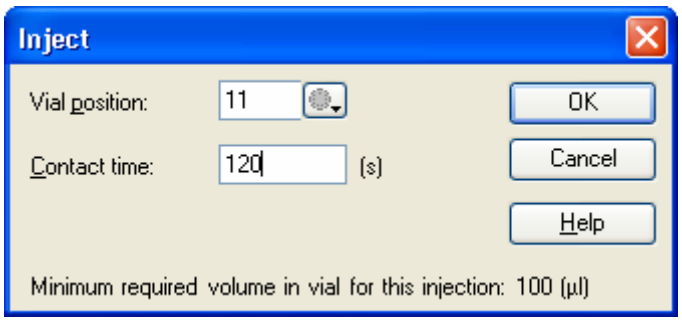
アナライトを添加する際は、**Injection command**（ ）をクリックする。

↓



Vial/well position:の（ ）をクリックし、サンプルをセットする位置にマウスを移動しクリックする。

↓



Contact time:にアナライト添加時間（通常 60 秒～120 秒）を入力すると、必要量がダイアログ下部に表示される。バイアル内に必要量があることを確認する。相互作用測定の条件検討の詳細は、D-1.（VII ページ）を参照。

OK をクリックする。

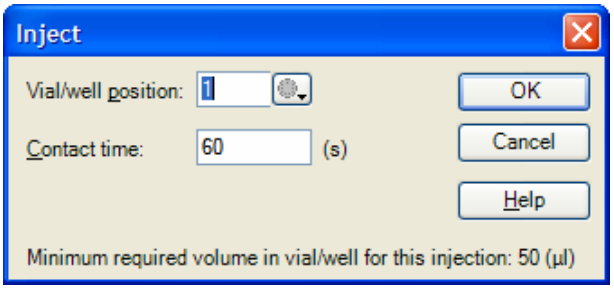
（この時点でサンプルをラックにセットする場合は、一旦、**Cancel** をクリックし、**Inject** ダイアログを解除する。）

↓

Load Samples アイコン（ ）を選択する。

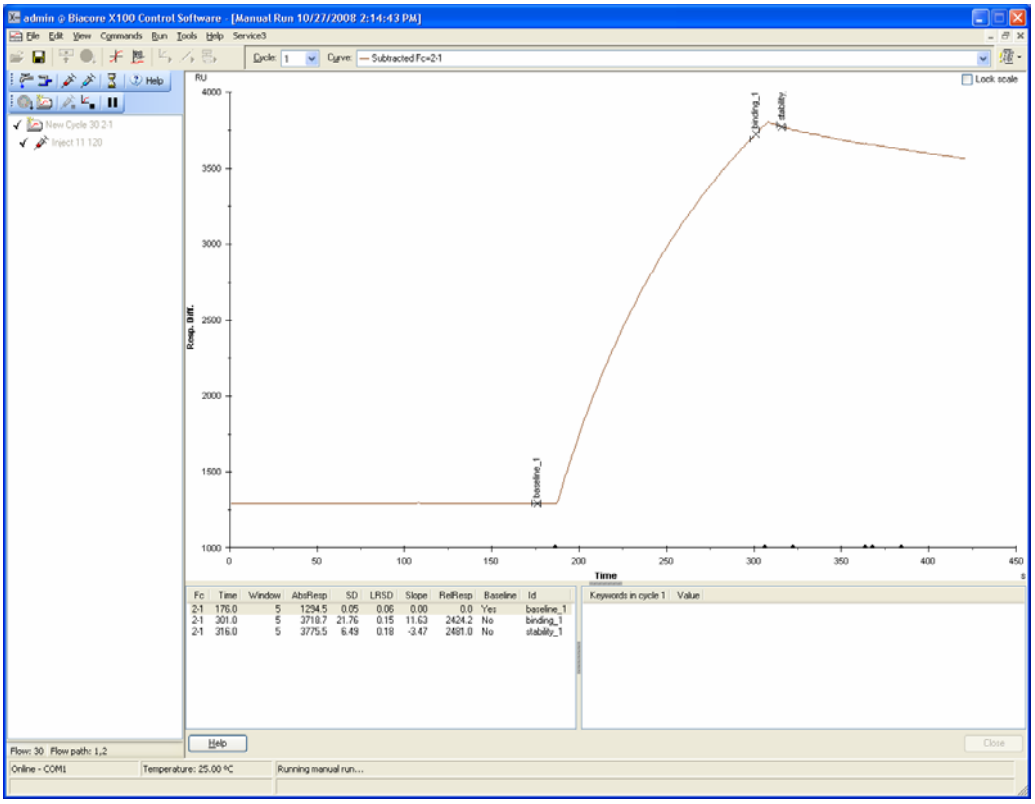
ラックを取り出し、適切な量のサンプルを分注したバイアルをセットする。
ラックを再び装置にセットし、OK を選択する。再び、**Injection command**（ ）をクリックする。

↓



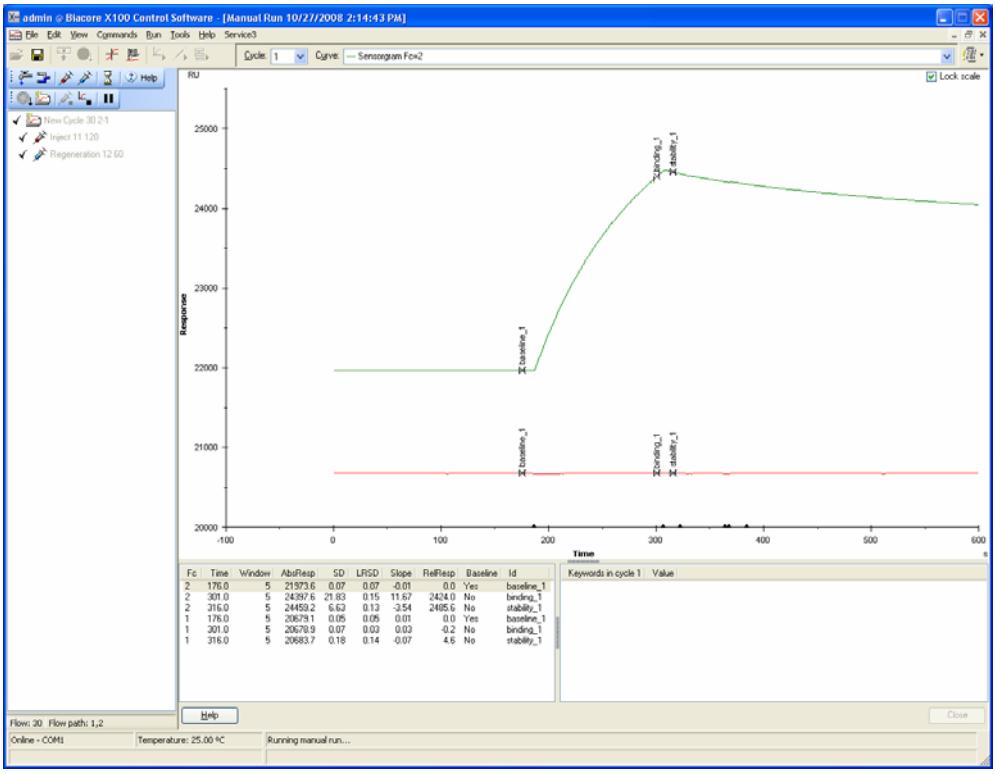
サンプル位置および添加時間（秒）を入力する。

↓



2-1 の差し引きのセンサーグラムを表示し、特異的結合が見られるかどうか確認する。

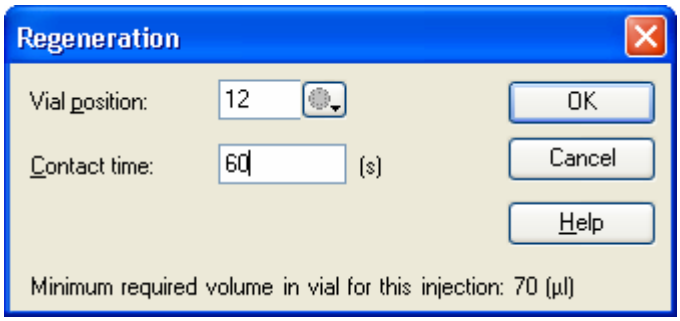
↓



リファレンスセルへの非特異的吸着がないかどうか、確認する。

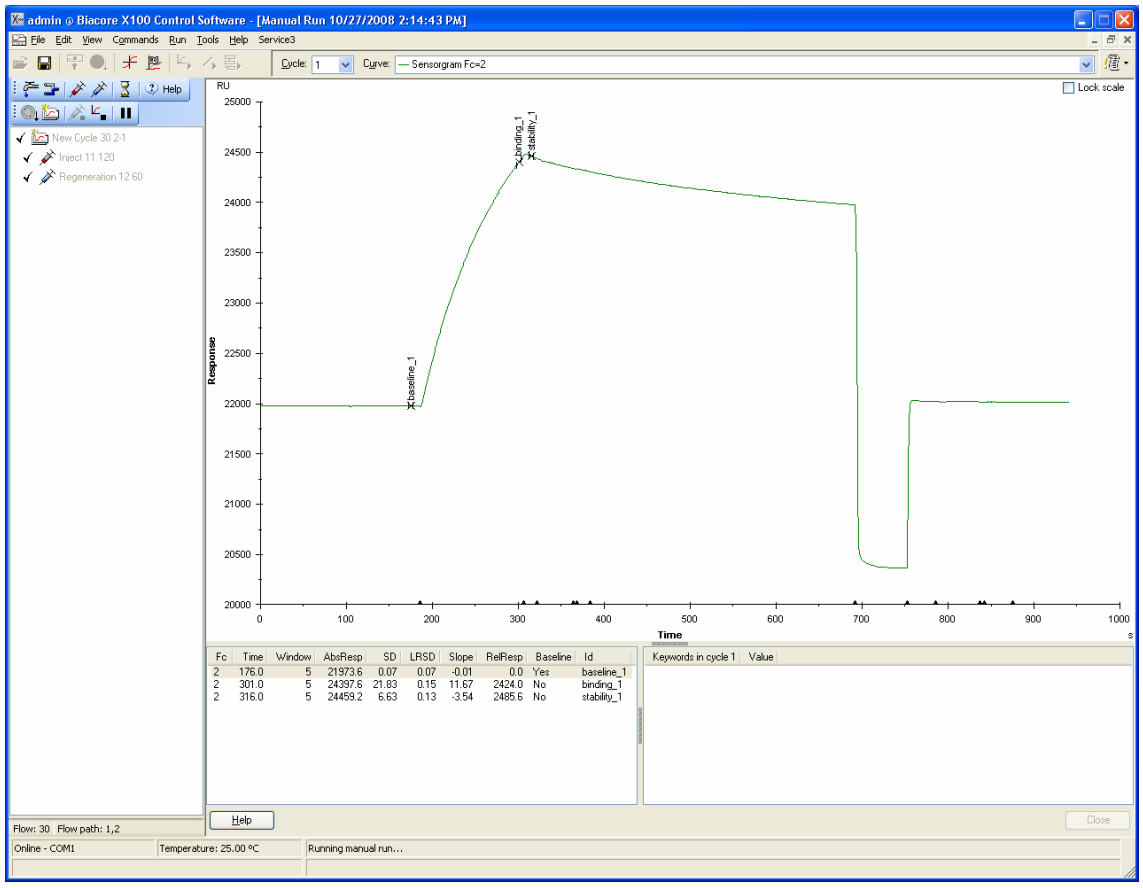
再生条件の検討

再生溶液を添加する際は、**Regeneration Command...**（ ）をクリックする。



再生溶液の種類、添加時間については、VIII ページを参照する。

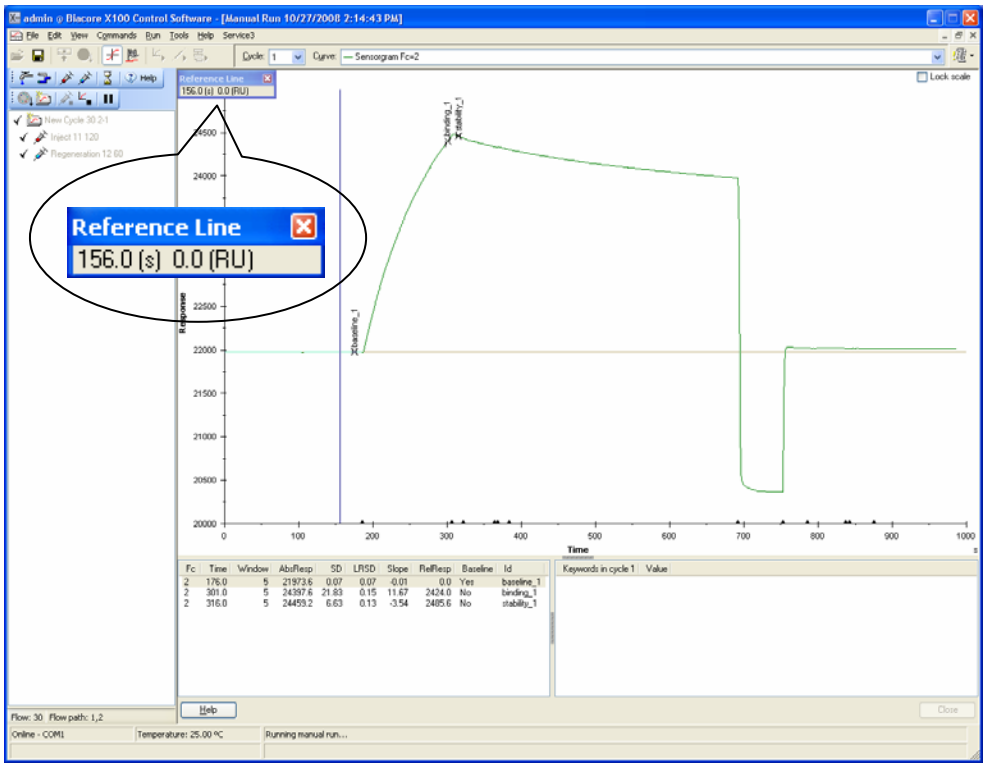
↓



（再生溶液添加後の結合量の確認）

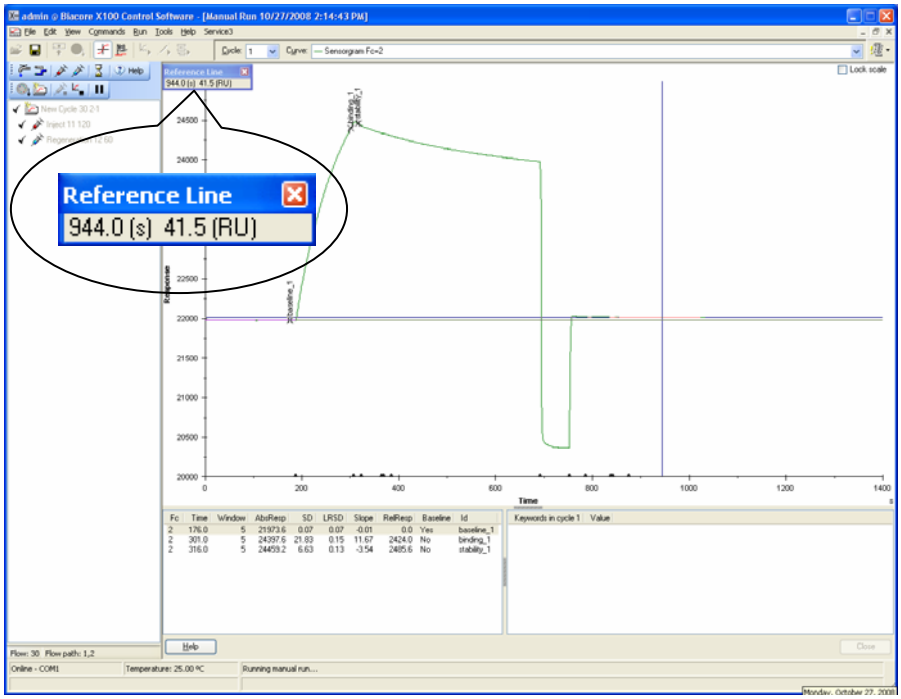
View → **Reference Line**（ ）をクリックする。

↓



リファレンスラインの縦軸を、左ボタンのクリック＆ドラッグでアナライト添加前に移動させ、**View** → **Baseline** をクリックする。リファレンスラインウィンドウが 0 になる。

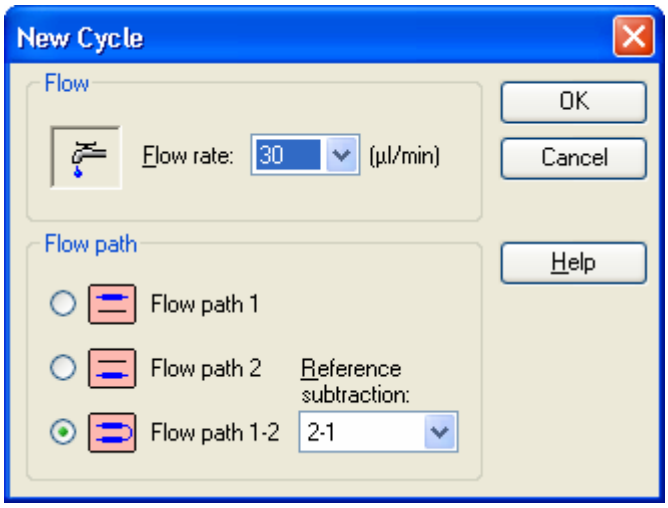
↓



再生溶液添加後に、リファレンスラインの縦軸を左ボタンのクリック＆ドラッグで移動し、再生後のアナライト結合量を確認する。

新規サイクルへの変更

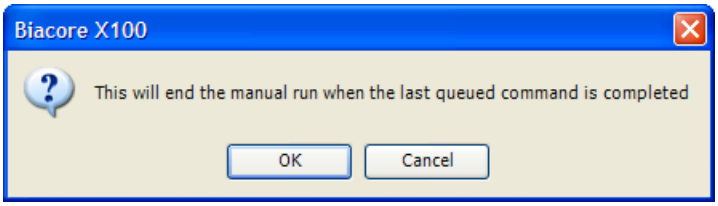
New Cycle...アイコン（ ）もしくは、メニューバーの **Commands** → **New Cycle...**をクリックする。



流速、Flow path の設定を確認後、**OK** をクリックする。
測定サイクルが切り替わる。

測定の終了

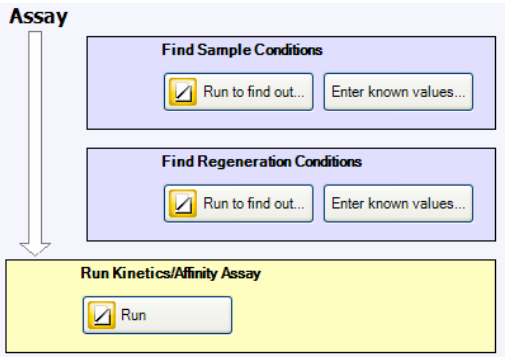
End manual run アイコン（ ）またはメニューバーの **Run** → **Stop Run...**をクリックする。



OK をクリックする。指定したコマンドを全て実行した後に、自動的に **Standby** 状態になる。

3-4-2. ウィザード測定による条件検討

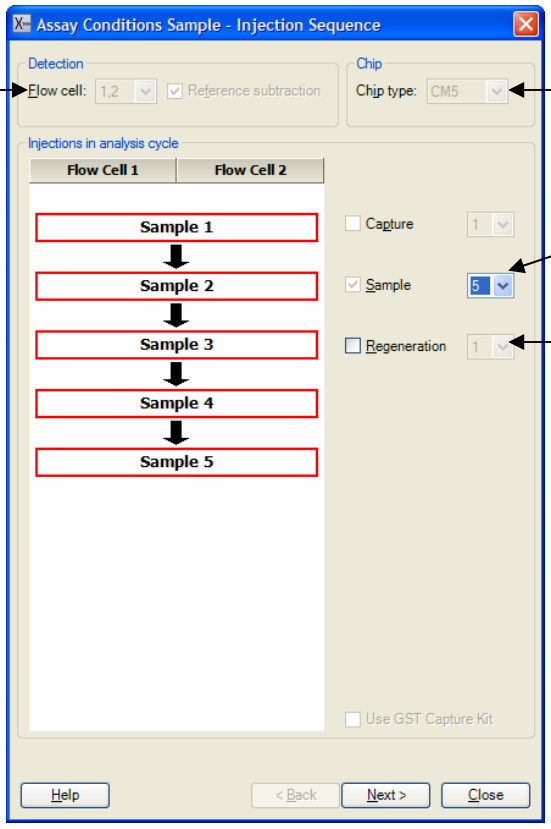
アナライトの条件検討



ワークフローシートの **Find Sample Conditions** → **Run to find out...**をクリックする。（既に条件が決まっている場合には、**Enter known values...**をクリックして、条件を入力する。）

↓

フローセル 1,2 に自動設定されている。また、**Reference subtraction** が自動選択され、リファレンスセル（フローセル 1）と固定化セル（フローセル 2）の差し引きセンサーグラムがリアルタイムに表示される。



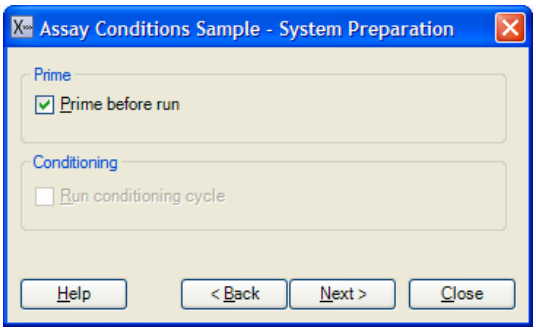
ワークフローで指定したセンサーチップが自動選択される。

最大 5 アナライトの添加が可能。

チェックを入れると、相互作用検討後に再生溶液を添加することができる。初めて相互作用の検討を行う際は、次の **Find Regeneration Step** で検討を行うことを勧める。

Next>をクリックする。

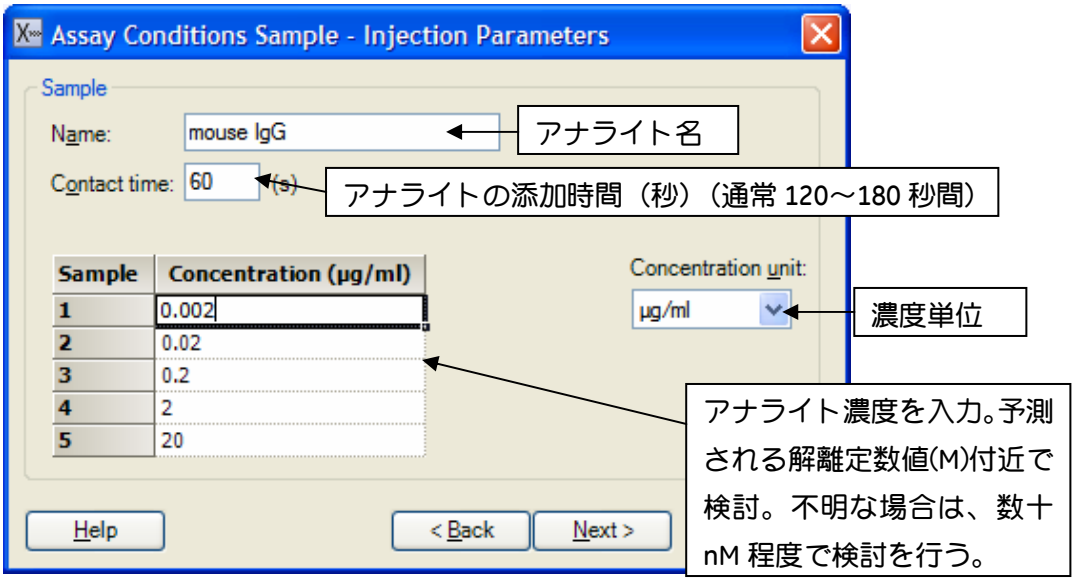
↓



Prime before run　　測定前に **Prime** を実行する場合は、チェックする。

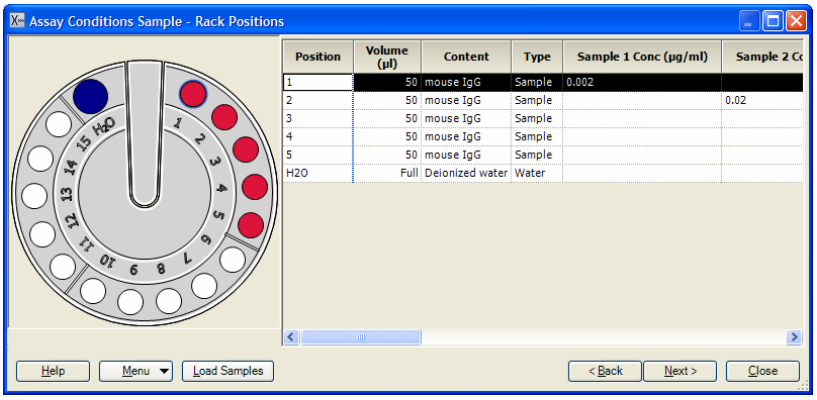
Next>をクリックする。

↓



Next>をクリックする。

↓



Rack Positions ダイアログが表示される。テーブルに従いアナライトをラックにセットする。**Next>**をクリックする。

↓

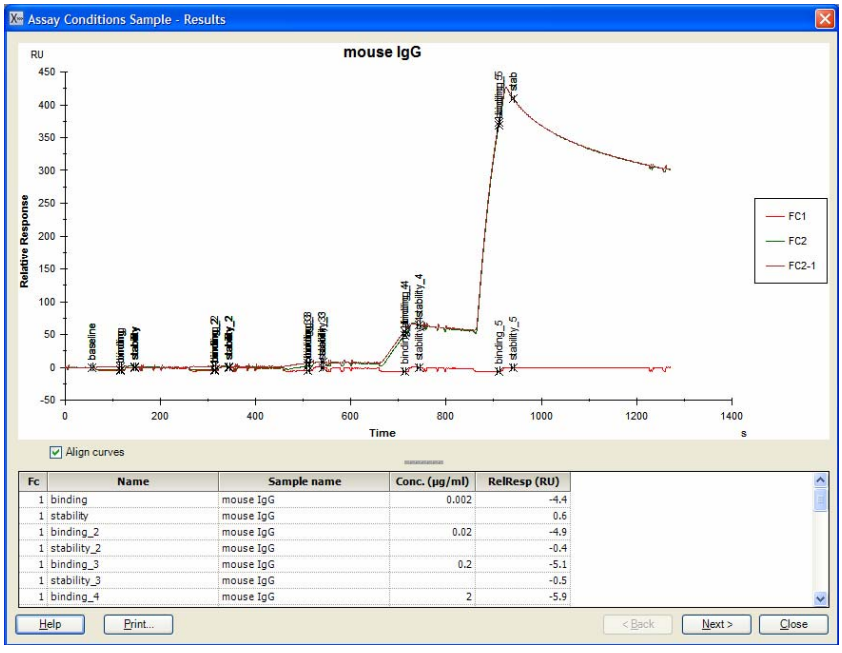
確認画面が表示される。確認後、**Start** をクリックする。

↓

結果の保存先とファイル名を指定後、**Save** をクリックする。測定を緊急停止したい場合は、Ctrl キーと Break キーを同時に押す。補足 3-2.（30 ページ）を参照。

↓

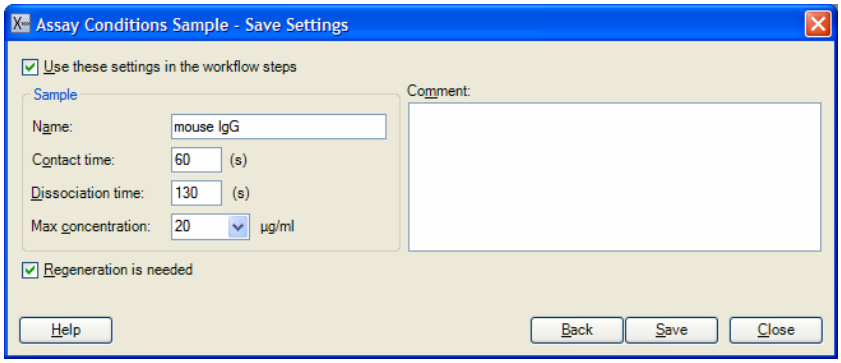
↓



Fc	Name	Sample name	Conc. (µg/ml)	RelResp (RU)
1	binding	mouse IgG	0.002	-4.4
1	stability	mouse IgG		0.6
1	binding_2	mouse IgG	0.02	-4.9
1	stability_2	mouse IgG		-0.4
1	binding_3	mouse IgG	0.2	-5.1
1	stability_3	mouse IgG		-0.5
1	binding_4	mouse IgG	2	-5.9

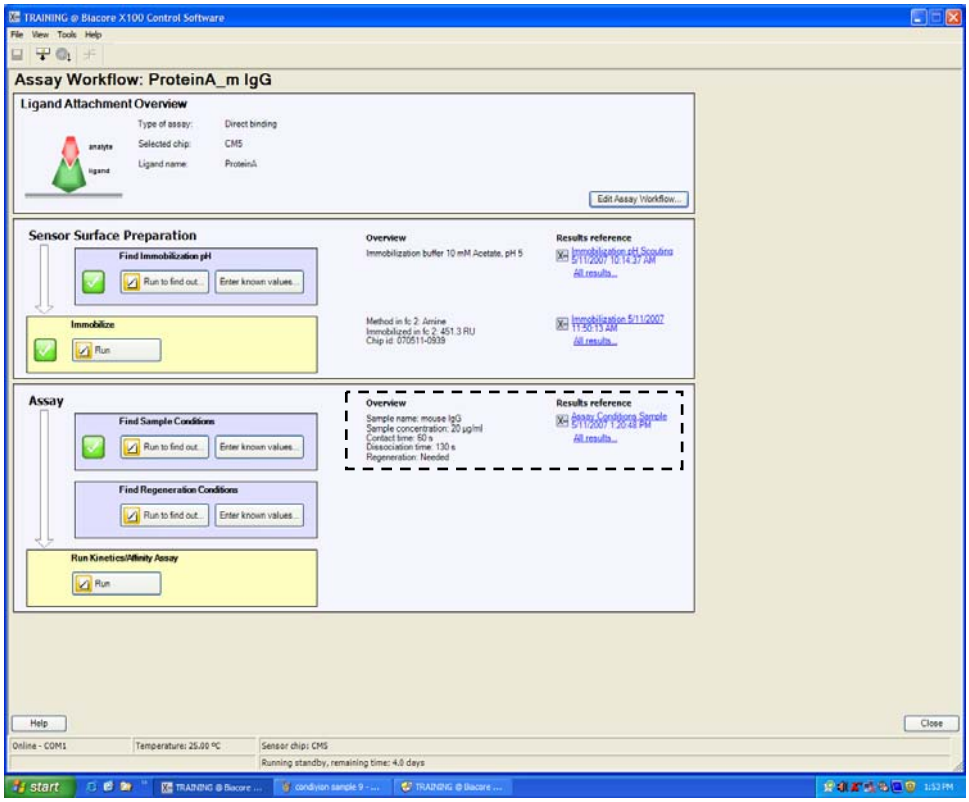
測定が終了後、**Results** ダイアログが表示される。装置は **Standby** 状態になる。
レポートポイントテーブルで結合量の確認を行う。
Next>をクリックする。

↓



Save Settings ダイアログが表示される。
測定結果を考慮し、添加時間、解離時間、最大濃度、再生の必要性を決定する。
Save をクリックする。

↓

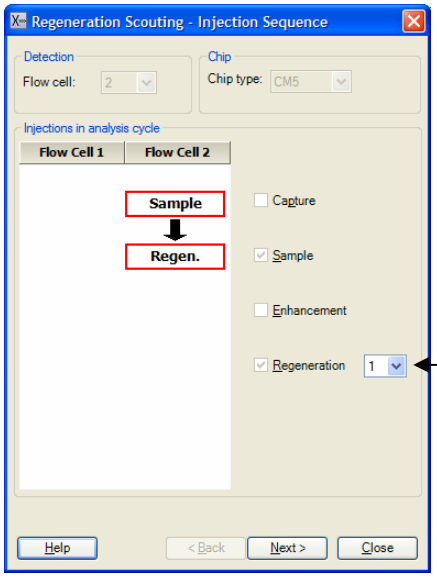


ワークフローシートの、**Assay** → **Find Sample Conditions** の **Run to find out...**に（ ✅ ）が入る。**Overview** にアナライト添加時間と解離時間、最大濃度等が表示される。

再生条件の検討

Find Regeneration Conditions → **Run to find out...**をクリックする。(既に条件が決まっている場合には、**Enter known values...**をクリックして、条件を入力する。)

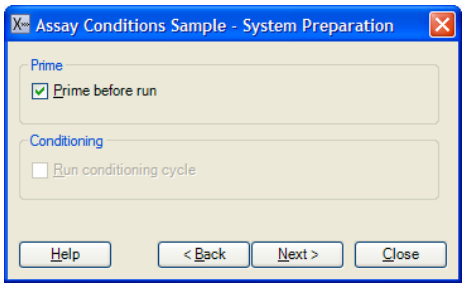
↓



最大 2 回の再生溶液の添加が可能

Next>をクリックする。

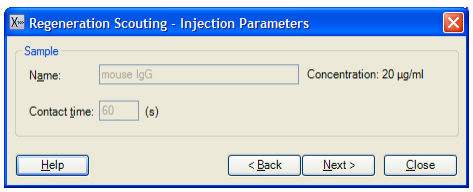
↓



Prime before run　　測定前に **Prime** を実行する場合は、チェックを入れる。

Next>をクリックする。

↓



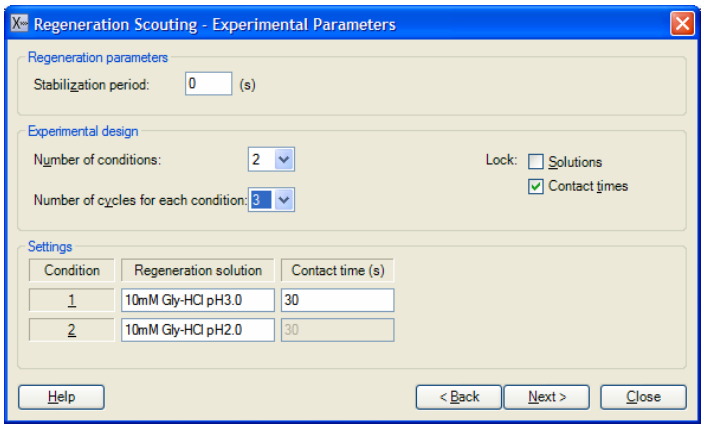
Injection Parameters ダイアログが表示される。

サンプルの各項目は、**Find Sample Conditions** で保存した条件が自動入力される。

(変更を行う場合は、**Find Sample Conditions** の **Enter known values...**をクリックして、条件を入力する。)

Next>をクリックする。

↓



Experimental Parameters ダイアログが表示される。

Regeneration parameters・・・

Stabilization period:　アナライト添加前のベースラインの安定化時間（秒）

Experimental design・・・

Lock:　Solutions のみにチェックを入れると、1 種類の再生溶液について、添加時間を変更した検討が可能。
Contact time のみにチェックを入れると、複数種類の再生溶液について、一定の添加時間で検討が可能。
Solutions および Contact time のチェックを外すと、再生溶液の種類および添加時間を個別に検討可能。

Number of conditions:　再生溶液の種類の数を選択する。最大 7 種類まで選択可能。再生条件の詳細は、VIII ページを参照。

Number of cycles for each conditions:
各再生溶液を用いた相互作用測定の繰り返しサイクル数。最大 5 サイクルまで選択可能。

Settings・・・

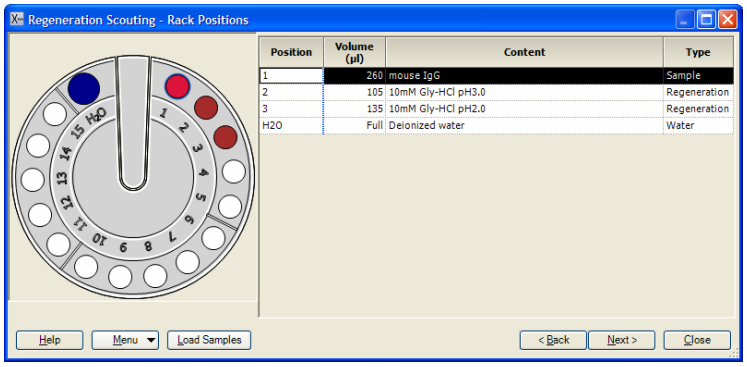
Regeneration solution　再生溶液名

Contact time(s)　再生溶液添加時間（秒）

再生溶液を 2 回添加する場合には、Regeneration solution1 および 2、Contact times 1 および 2 のカラムが表示される。

Next>をクリックする。

↓



Rack Positions ダイアログが表示される。テーブルに従いサンプルをラックにセットする。**Next>**をクリックする。

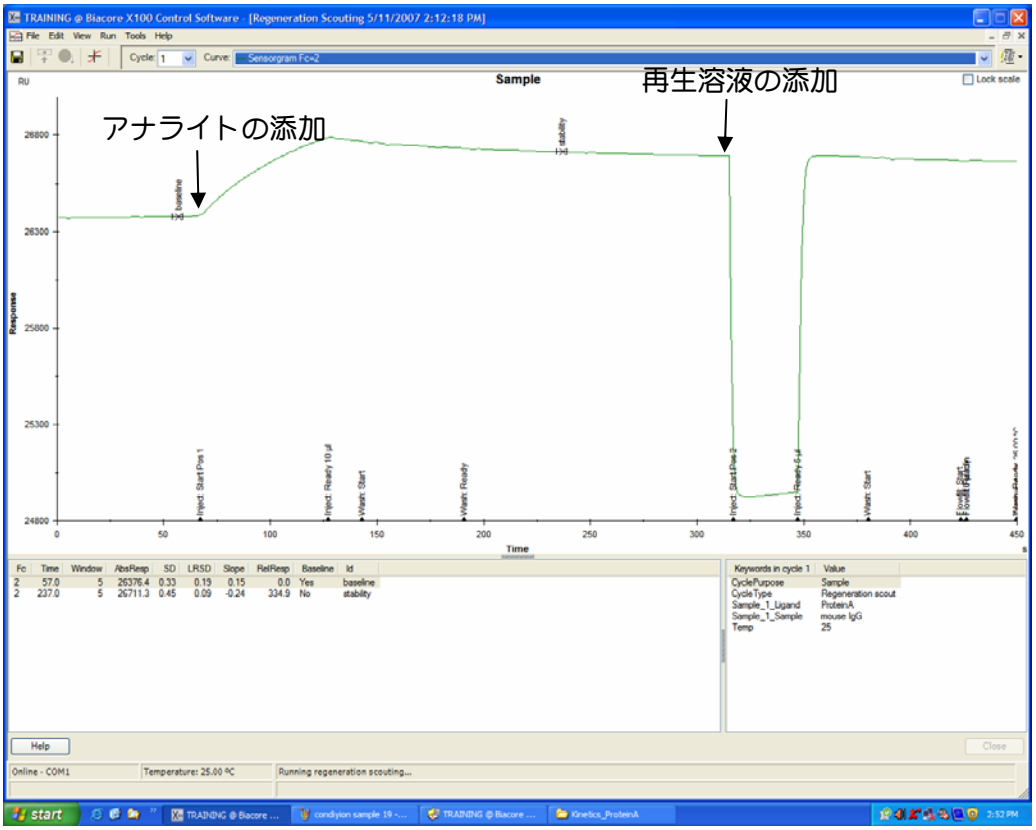
↓

確認画面が表示される。確認後、**Start** をクリックする。

↓

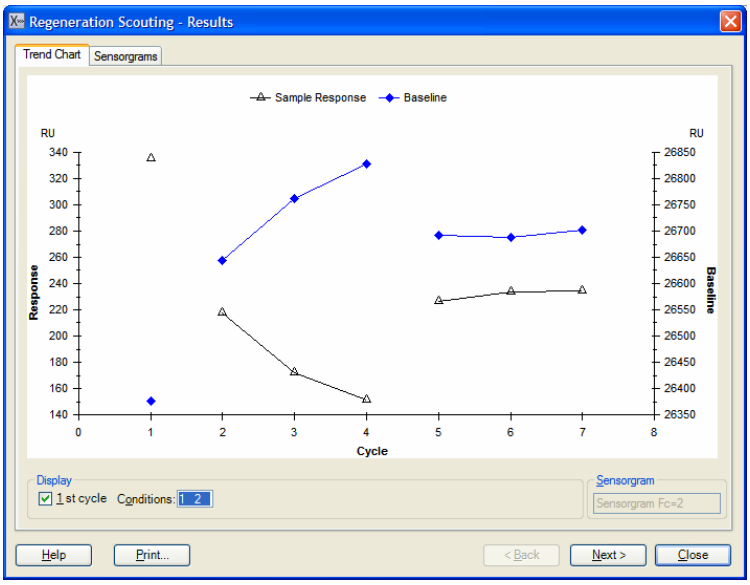
結果の保存先とファイル名を指定後、**Save** をクリックする。測定を緊急停止したい場合は、Ctrl キーと Break キーを同時に押す。補足 3-2.（30 ページ）を参照。

↓



アナライト添加と再生溶液添加を 1 サイクルとして、指定したサイクル数実行する。

↓



測定が終了後、**Result** ダイアログが表示される。装置は **Standby** 状態になる。

●Trend Chart タブ

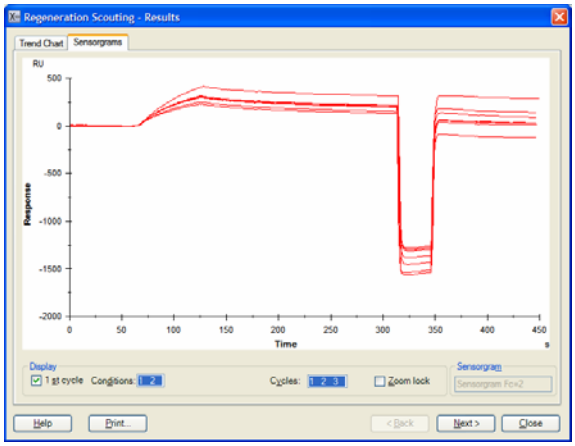
Response　　アナライトの結合量のプロット

Baseline　　再生後のベースラインのプロット

Display・・・　　1st cycle のチェックを外すと、1 サイクル目のデータが消える。

Conditions:　　結果の抽出が行える。

●Sensorgrams タブ

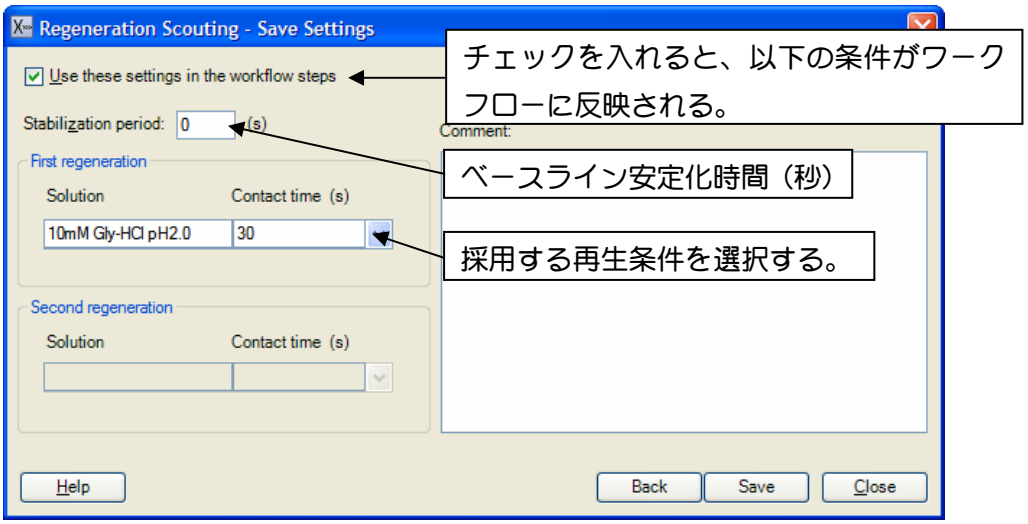


Display・・・　　選択しているセンサーグラムの重ね書きが表示される。

Cycles:　　測定サイクルの抽出が行える。

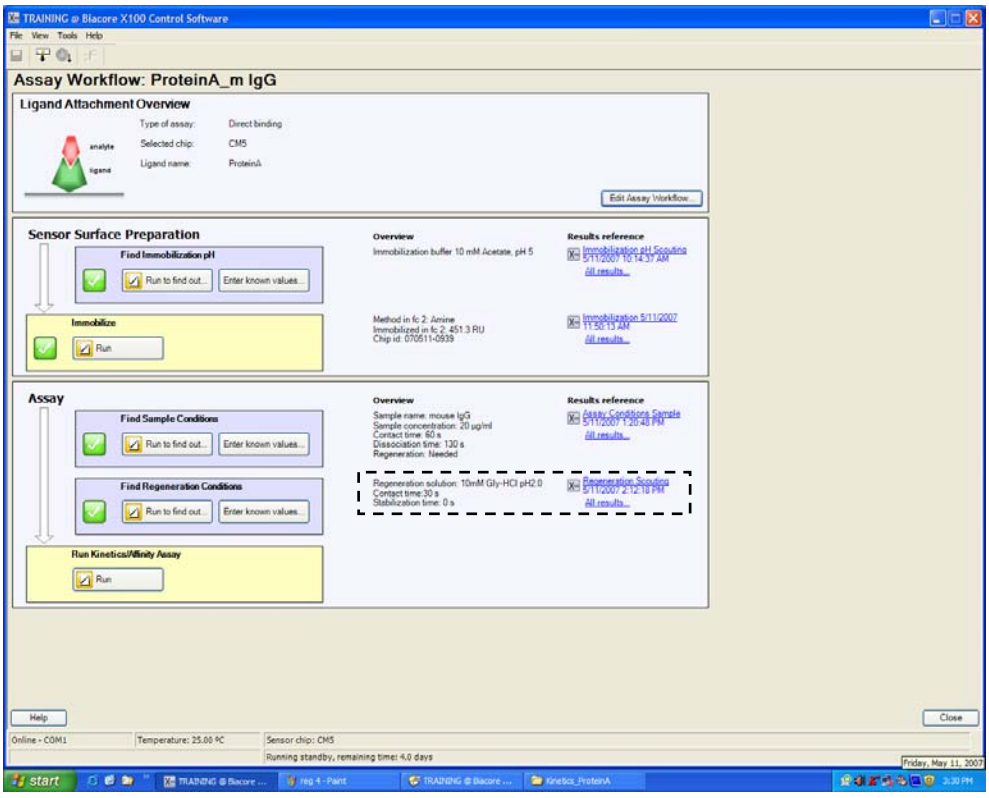
適当な再生条件が見つかれば、**Next>**をクリックする。
（適当な再生条件が見つからない場合は、**Close** をクリックし、再度、再生条件について検討しなおす。）

↓



Save をクリックする。保存条件が最終測定プログラムに反映される。

↓

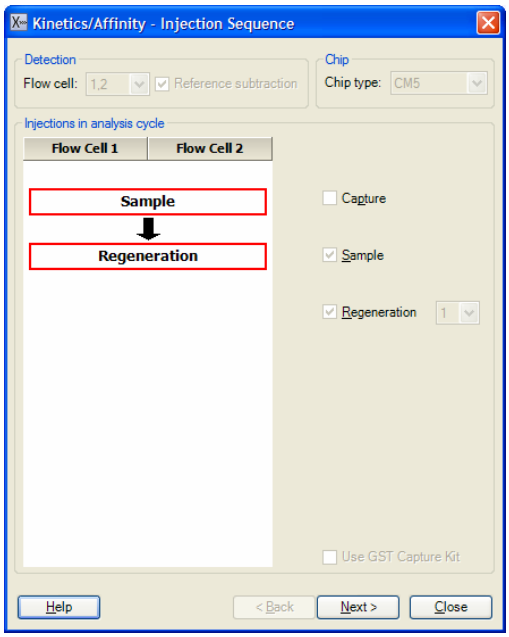


ワークフローシートの、**Assay** → **Find Regeneration Conditions** の **Run to find out...**に（ ☑ ）が入る。**Overview** に再生溶液名、添加時間等が表示される。

3-5. マルチサイクル法による測定の実行

Run Kinetics/Affinity Assay → **Run** をクリックする。

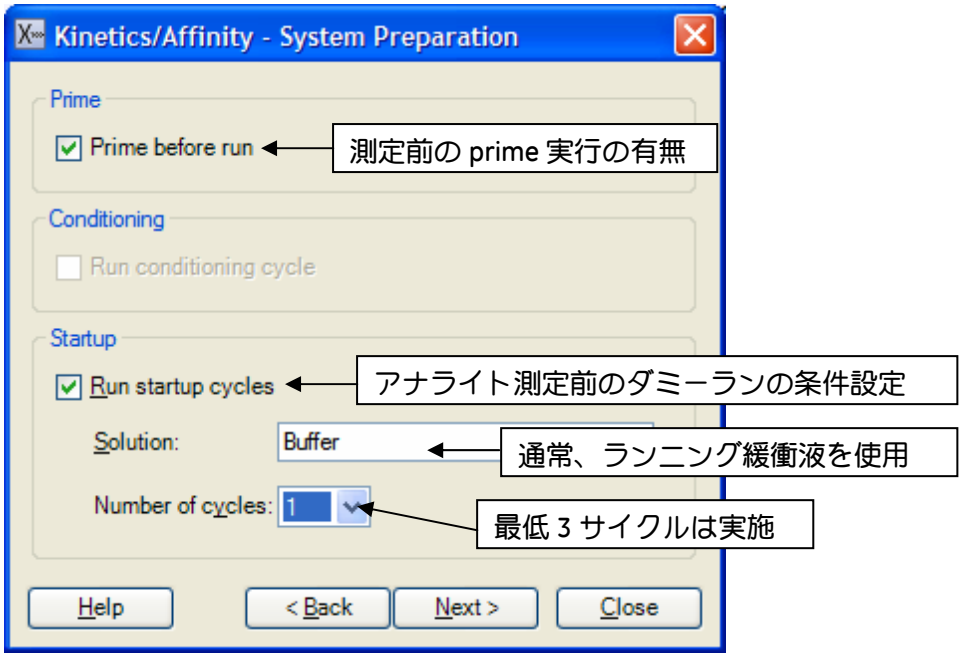
↓



Injection Sequence ダイアログが表示される。ワークフローで決定した条件が自動選択されている。この画面での変更は不可能。

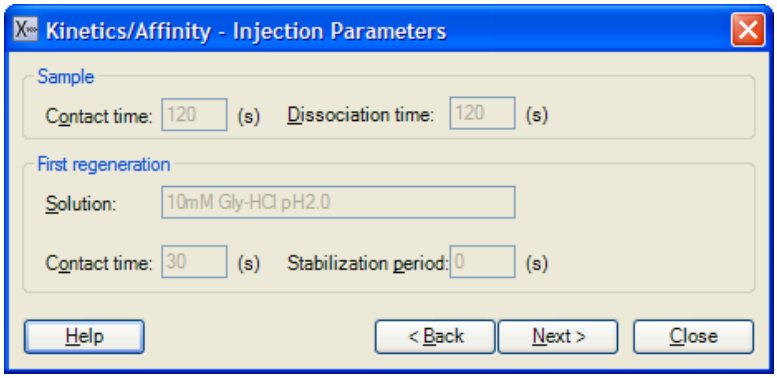
Next>をクリックする。

↓



Next>をクリックする。

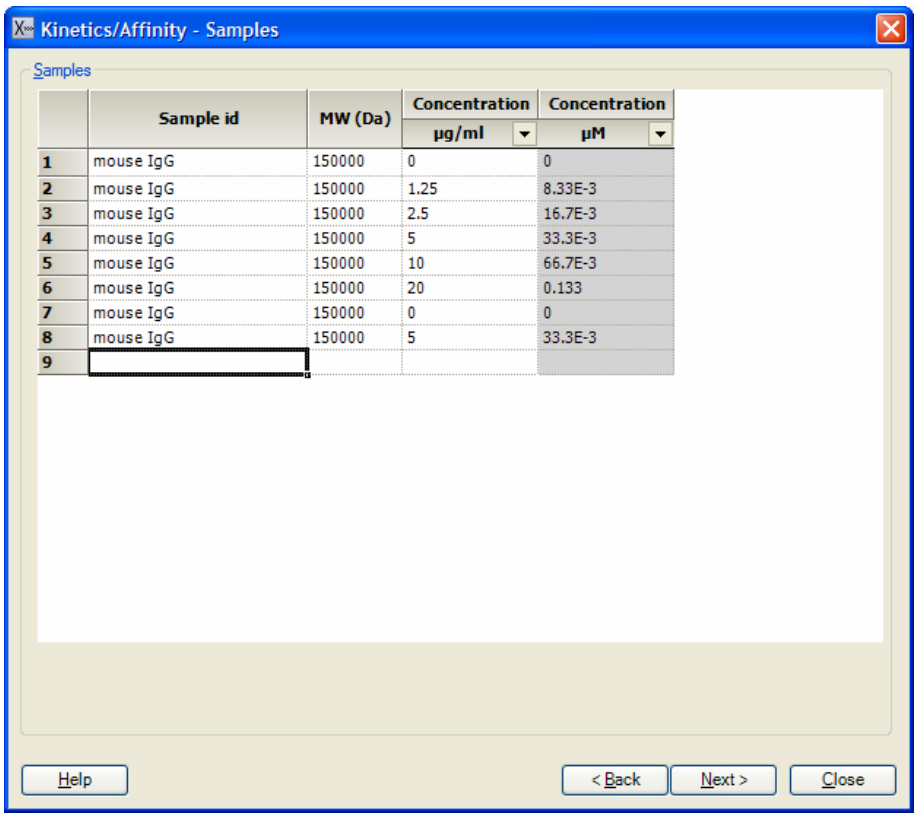
↓



Injection Parameters ダイアログが表示される。ワークフローで決定した条件が自動入力されている。この画面での変更は不可能。

Next>をクリックする。

↓

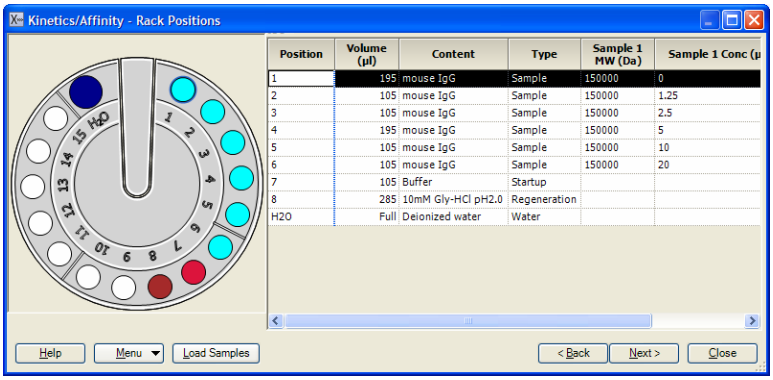


	Sample id	MW (Da)	Concentration µg/ml	Concentration µM
1	mouse IgG	150000	0	0
2	mouse IgG	150000	1.25	8.33E-3
3	mouse IgG	150000	2.5	16.7E-3
4	mouse IgG	150000	5	33.3E-3
5	mouse IgG	150000	10	66.7E-3
6	mouse IgG	150000	20	0.133
7	mouse IgG	150000	0	0
8	mouse IgG	150000	5	33.3E-3
9				

Sample ダイアログが表示される。**Sample id** および **Concentration** は、ワークフローで検討した情報が自動入力される。アナライト濃度は、最大濃度から 2 倍希釈系列で 5 点と、ゼロ濃度を 2 点、濃度系列の中 1 点を 2 回測定する設定となっている。必要に応じて変更可能。単位の変更は をクリックする。詳細は、D-2.（IX ページ）を参照。

Samples のテーブルの **MW(Da)**に、アナライト分子量(Da)を入力する。

↓


Kinetics/Affinity - Rack Positions
Position
Volume (µl)
Content
Type
Sample 1 MW (Da)
Sample 1 Conc (µ
1 195 mouse IgG Sample 150000 0
2 105 mouse IgG Sample 150000 1.25
3 105 mouse IgG Sample 150000 2.5
4 195 mouse IgG Sample 150000 5
5 105 mouse IgG Sample 150000 10
6 105 mouse IgG Sample 150000 20
7 105 Buffer Startup
8 285 10mM Gly-HCl pH2.0 Regeneration
H2O Full Deionized water Water
Help
Menu
Load Samples
< Back
Next >
Close

Rack Positions ダイアログが表示される。テーブルに従いサンプルをラックにセットする。**Next>**をクリックする。

↓

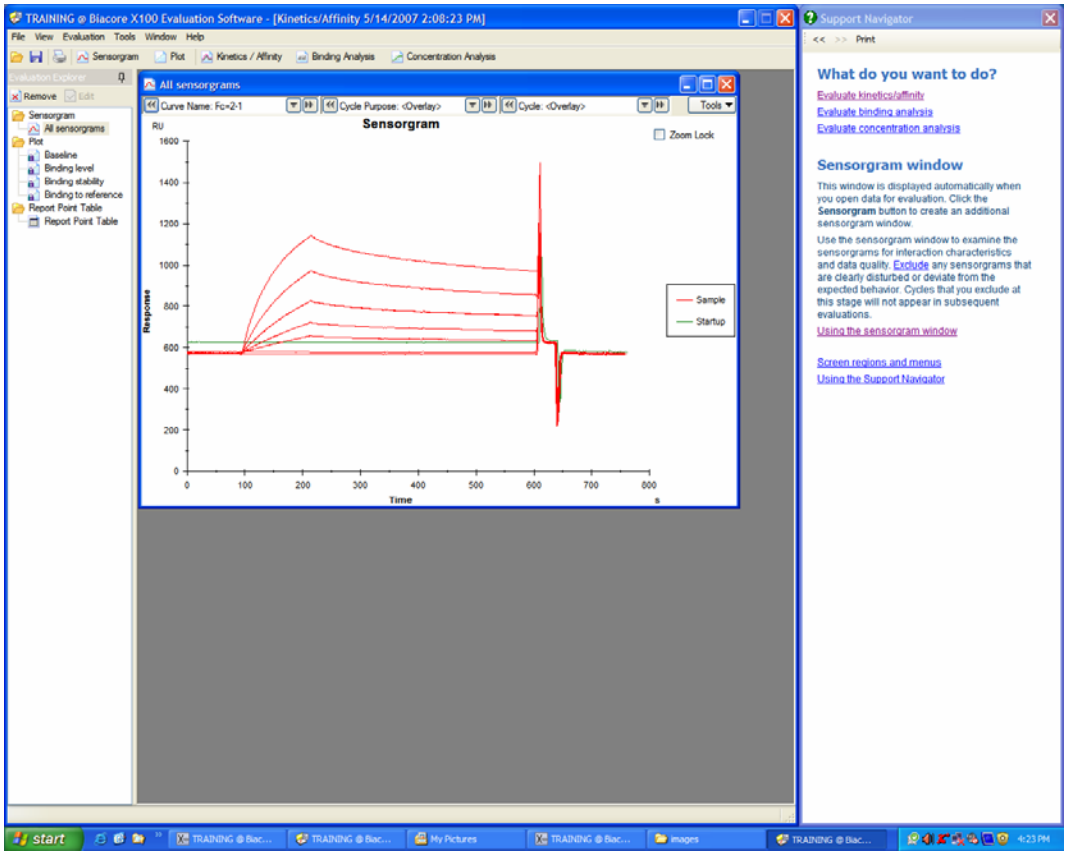
確認画面が表示される。確認後、**Start** をクリックする。

↓

結果の保存先とファイル名を指定後、**Save** をクリックする。測定を緊急停止したい場合は、Ctrl キーと Break キーを同時に押す。補足 3-2.（30 ページ）を参照。

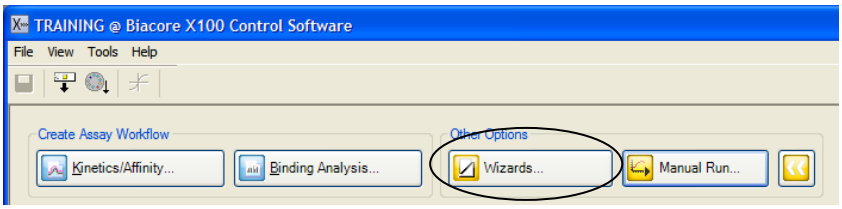
↓

測定が終了すると、装置は **Standby** 状態になる。また、取得データは自動保存され、解析に向け Biacore X100 Evaluation Software 上で開かれる。



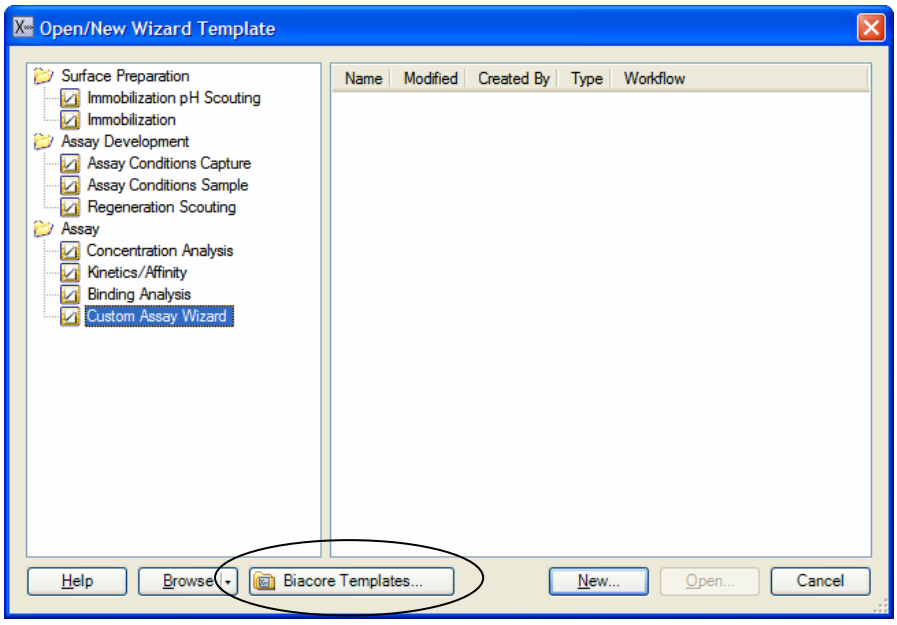
3-6. シングルサイクル法の実行

シングルサイクル法で測定を実施する場合、ワークフローにシングルサイクル法のウィザードが紐付けされていない。ワークフローを使用している場合は、一旦閉じて、シングルサイクル法のウィザードを作成する。



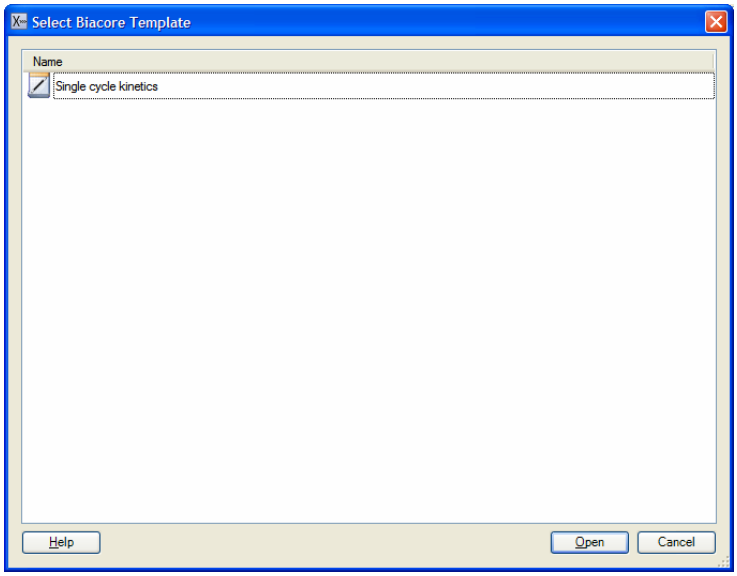
Other Options → **Wizards...** をクリックする。

↓



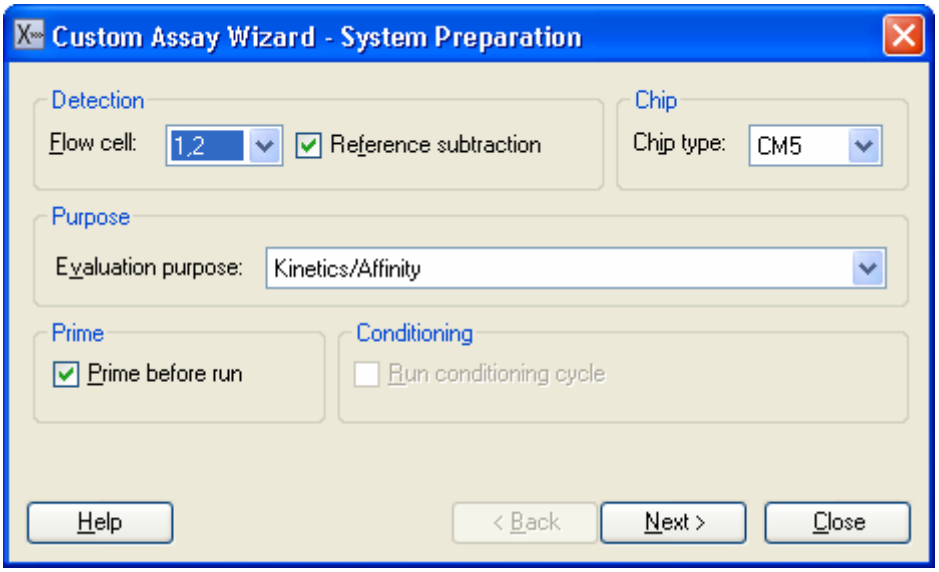
Biacore Templates...をクリックする。

↓



Single cycle kinetics を選択し、**Open** をクリックする。

↓



System Preparation ダイアログが表示される。

Detection:・・・

Flow cell:　検出するフローセルを選択。通常、1,2 を選択。
Reference subtraction にチェックを入れる。フローセル 2-1 のセンサーグラムをリアルタイムに検出する。

Chip・・・

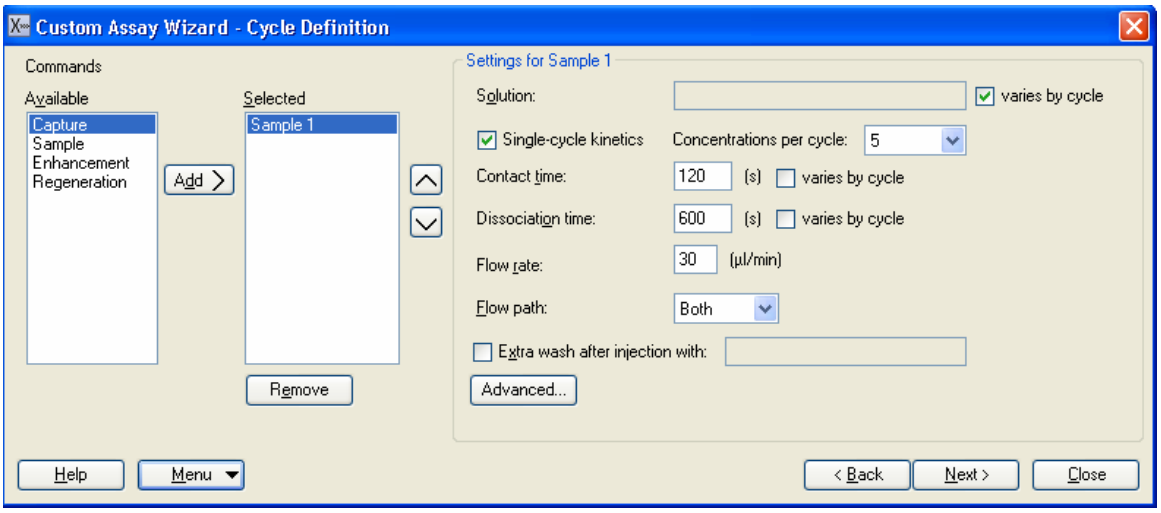
Chip type:　利用するセンサーチップを選択する。

Purpose・・・

Evaluation purpose:　必ず、Kinetics/Affinity を選択する。

Prime before run　測定前に Prime を実行する場合に、チェックを入れる。

↓



Cycle Definition ダイアログが表示される。

Commands・・・　1 サイクルで実行する作業の指定を行う。**Selected** のテーブルに指定した順番で実行される。
キャプチャー法および再生溶液を添加する場合には、**Available** からコマンドを選択し、**Add>**をクリックし、コマンドの追加を行う。詳細は、補足 3-9.（68 ページ）を参照。

Setting for Sample 1・・・

Single-cycle kinetics　必ずチェックを入れる。

Concentration per cycle:　1 サイクルに添加するアナライト数を選択。最大 5 濃度まで添加可能。通常は、5 濃度で測定を行う。

Contact time:　アナライト添加時間（秒）、通常 120～180 秒間

Dissociation time:　解離時間（秒）、通常 120～180 秒間

Flow rate:　流速(µl/min)、通常 30 µl/min

Flow path:　Both を選択。フローセル 1,2 に添加する。

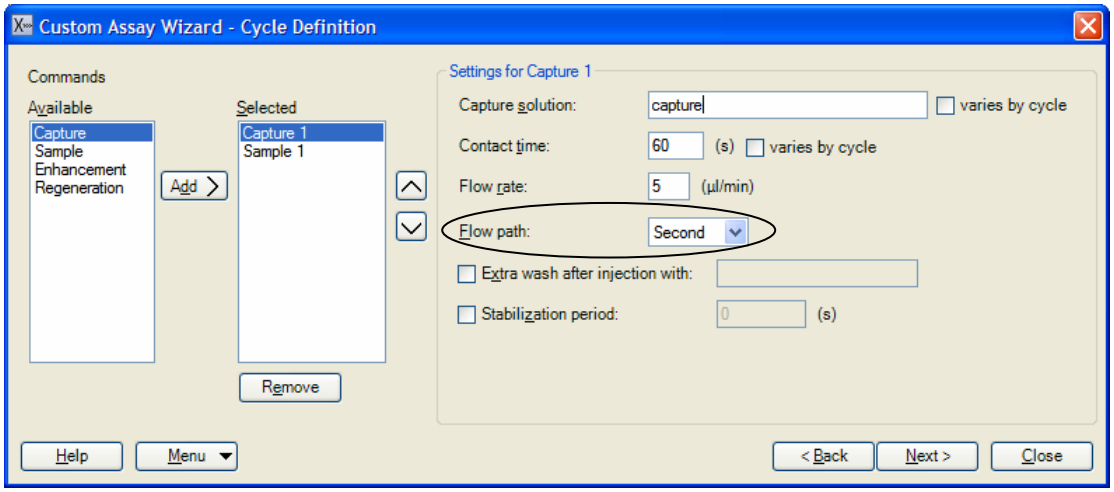
Extra wash after injection with:
アナライト添加後の流路の洗浄を行う。洗浄溶液はフローセル表面には流れない。必要があればチェックし、洗浄溶液を入力する。

補足 3-9. キャプチャー法を利用したウィザードの作成

Cycle definition ダイアログの、**Commands** → **Available** の **Capture** を選択し、**Add>**をクリックする。**Selected** に **Capture1** が追加される。 をクリックして、**Sample1** の上へ移動する。

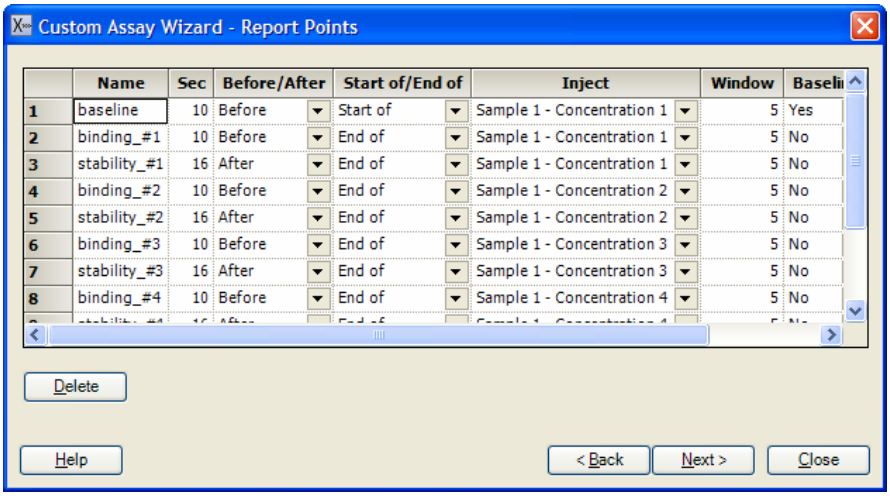
Settings for Capture 1 で、詳細条件を入力する。

Flow path:で、リガンドを添加するフローセルを指定する。通常は **Second** を選択。



Next>をクリックする。

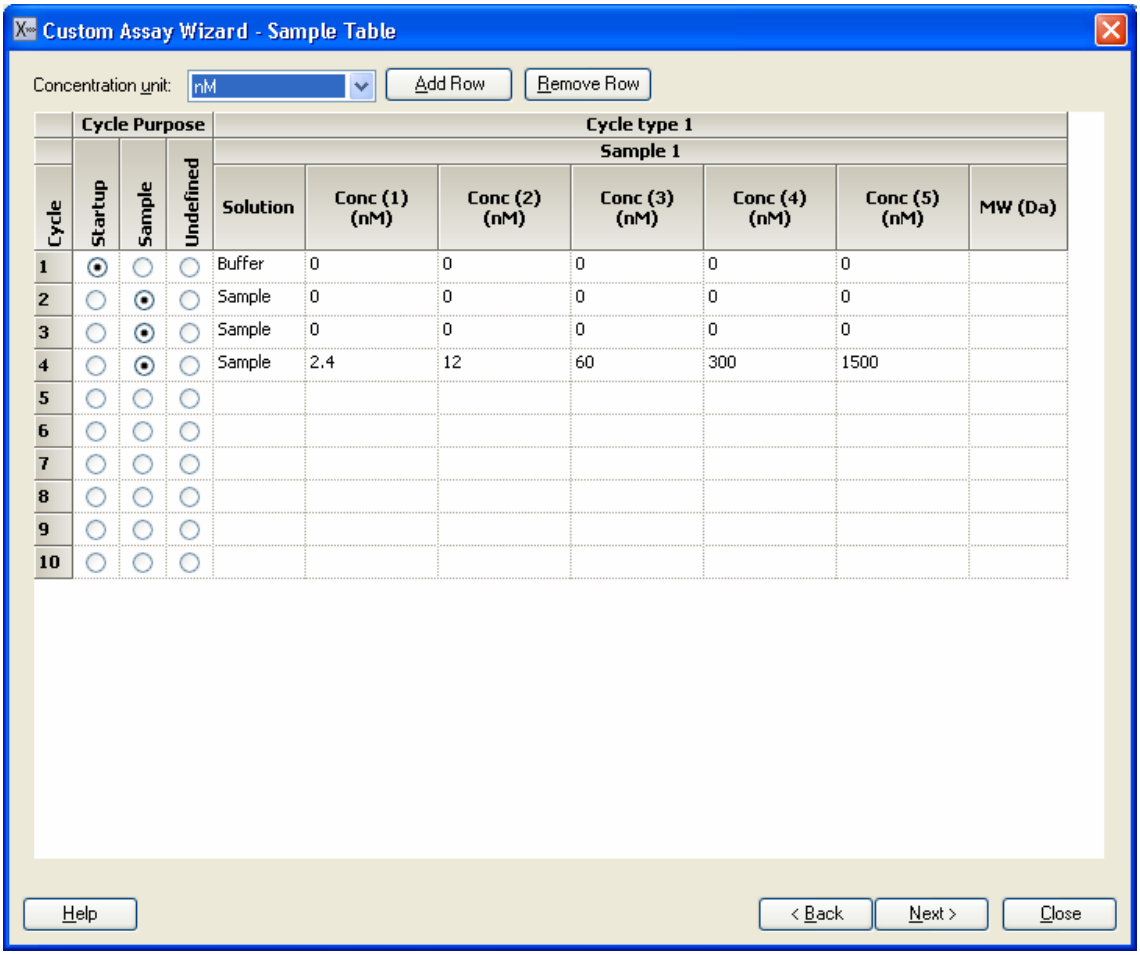
↓


Custom Assay Wizard - Report Points
Name
Sec
Before/After
Start of/End of
Inject
Window
Baseli
1 baseline 10 Before Start of Sample 1 - Concentration 1 5 Yes
2 binding_#1 10 Before End of Sample 1 - Concentration 1 5 No
3 stability_#1 16 After End of Sample 1 - Concentration 1 5 No
4 binding_#2 10 Before End of Sample 1 - Concentration 2 5 No
5 stability_#2 16 After End of Sample 1 - Concentration 2 5 No
6 binding_#3 10 Before End of Sample 1 - Concentration 3 5 No
7 stability_#3 16 After End of Sample 1 - Concentration 3 5 No
8 binding_#4 10 Before End of Sample 1 - Concentration 4 5 No
Delete
Help
< Back
Next >
Close

Report points ダイアログが表示される。

Next>をクリックする。

↓



Cycle	Cycle Purpose: Startup	Sample	Undefined	Cycle type 1 / Sample 1: Solution	Conc (1) (nM)	Conc (2) (nM)	Conc (3) (nM)	Conc (4) (nM)	Conc (5) (nM)	MW (Da)
1	◉	○	○	Buffer	0	0	0	0	0	
2	○	◉	○	Sample	0	0	0	0	0	
3	○	◉	○	Sample	0	0	0	0	0	
4	○	◉	○	Sample	2.4	12	60	300	1500	
5	○	○	○							
6	○	○	○							
7	○	○	○							
8	○	○	○							
9	○	○	○							
10	○	○	○							

Sample Table ダイアログが表示される。

Concentration unit :　アナライトの濃度単位を選択する。

Cycle Purpose :　測定サイクルの目的の指定を行う。カラムの○をクリックし選択する。

Sample　アナライトの測定サイクル。必ず 0 濃度を 1 サイクル以上測定する。

Startup　アナライト測定前の、ダミーサイクル。通常は、アナライトの添加の代わりにランニング緩衝液を使用。

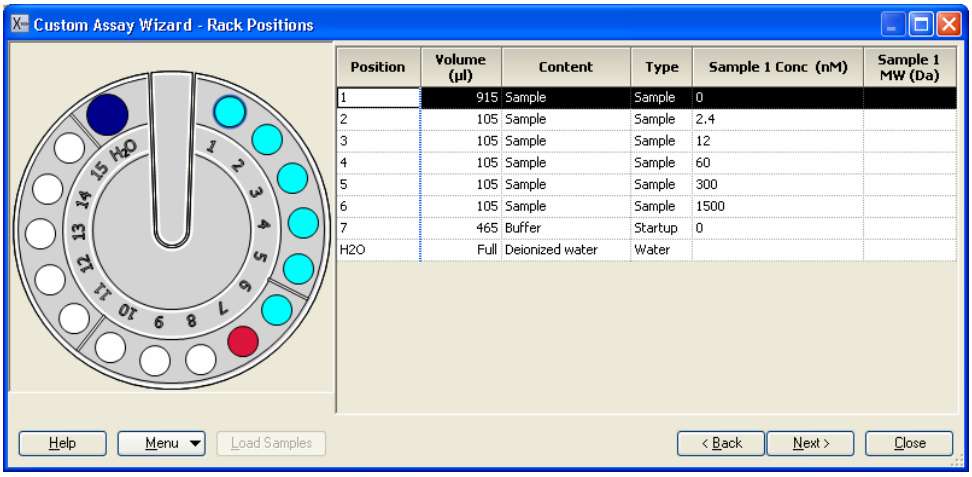
Undefined　上記以外の目的。

サイクル数を増やしたい場合には、**Add Row** をクリックする。

テーブル右の **Conc** カラムに濃度を入力する。アナライトは、1nM～1 μM の範囲で、5 倍希釈系列で 5 濃度（例：2.4, 12, 60, 300, 1500 nM）調製する。アナライトの濃度は低濃度から入力する。詳細は、D-2.（XI ページ）を参照。

Next>をクリックする。

↓

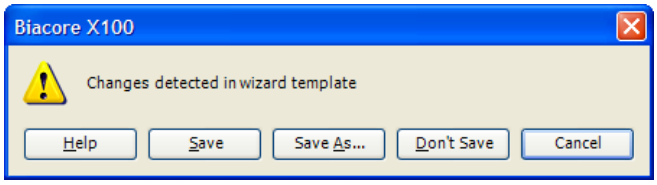


Rack Positions ダイアログが表示される。テーブルに従いサンプルをラックにセットする。**Next>**をクリックする。

↓

確認画面が表示される。確認後、**Start** をクリックする。

↓



作成したテンプレートを保存するか聞かれる。必要があれば、**Save As...**で名前を付けて保存を行う。保存しない場合は、**Don't Save** をクリックする。

↓

結果の保存先とファイル名を指定後、**Save** をクリックする。測定を緊急停止したい場合は、Ctrl +キーと Break キーを同時に押す。補足 3-2.（30 ページ）を参照。

↓

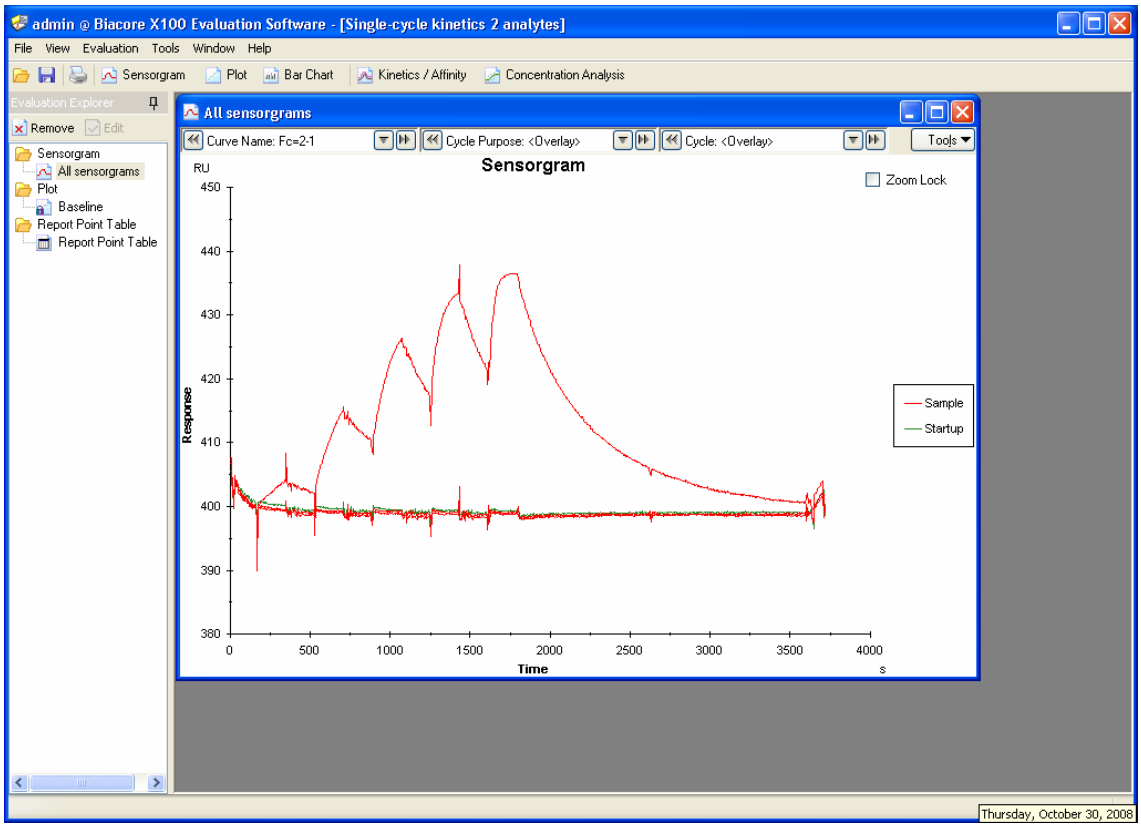
測定が終了すると、装置は **Standby** 状態になる。また、取得データは自動保存され、Biacore X100 Evaluation Software 上で開かれる。

別のアナライトについても測定を行う場合には、固定化し直すことを奨める。リガンドが安定な場合には、ランニング緩衝液を流し続け結合したアナライトを自然解離させ再測定することもできる。

3-7. データ解析

3-7-1. カイネティクス解析

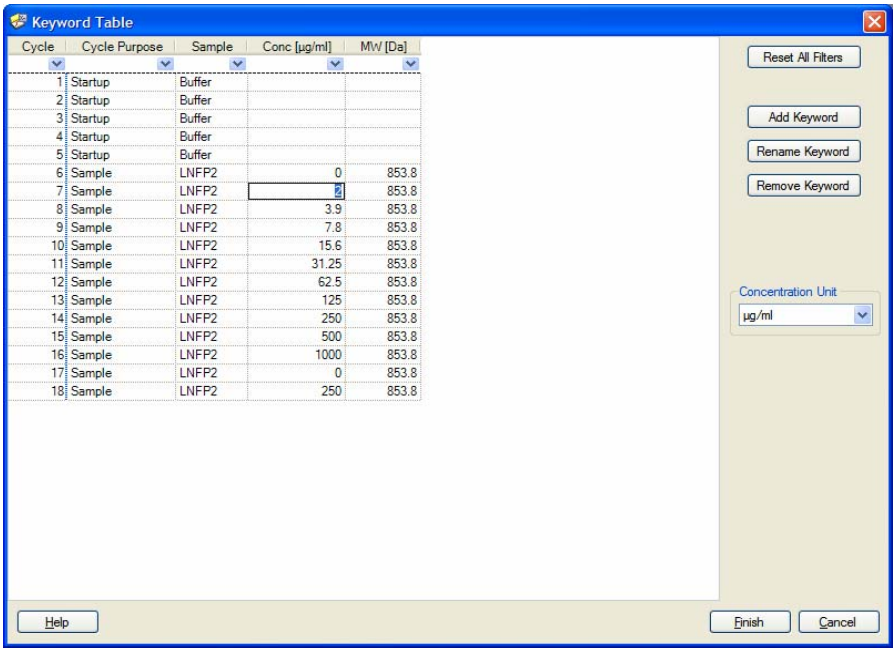
ここでは、シングルサイクル法で取得したデータを元に説明するが、マルチサイクル法の場合も、解析手順および評価方法は同じである。



Biacore X100 Evaluation Software のツールバーの　Kinetics / Affinity　をクリックする。(アナライト情報の入力ミスがあった場合には、予め変更を行う。補足 3-10.（72 ページ）を参照。)

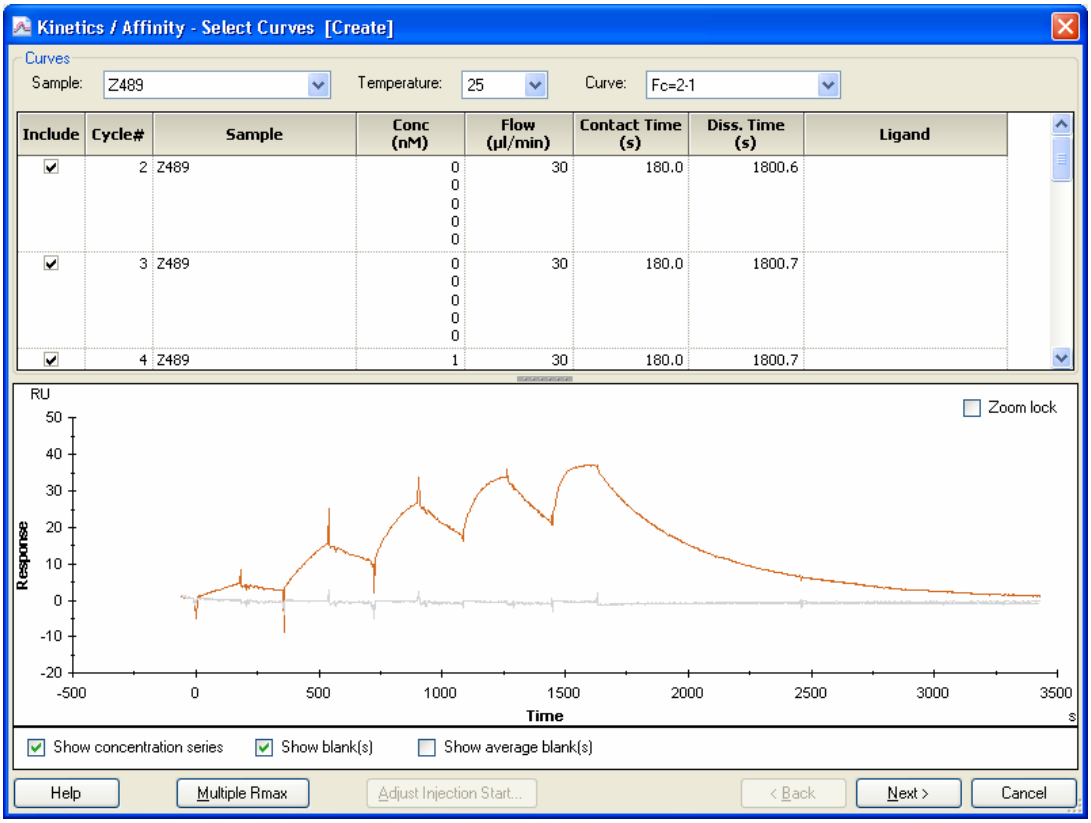
補足 3-10. アナライト情報の変更

アナライト濃度、濃度単位、アナライト名などの入力ミスがあった場合は、**Keyword Table** から入力を変更する。**Tools...** → **Keyword Table...**をクリックする。



各セルをクリックして、変更を行う。

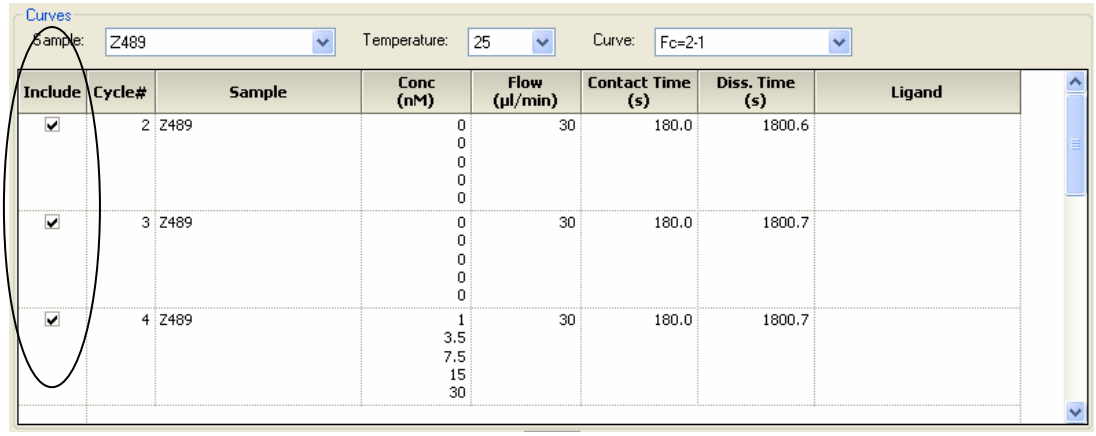
↓



同一アナライト名のセンサーグラムが重ね書き表示される。複数のアナライトについ同時測定している場合は、**Sample:**右側の ▼ をクリックし、解析したいアナライトを選択する。必要に応じて、センサーグラムの抽出を行う。補足 3-11.を参照。

補足 3-11. センサーグラムの抽出

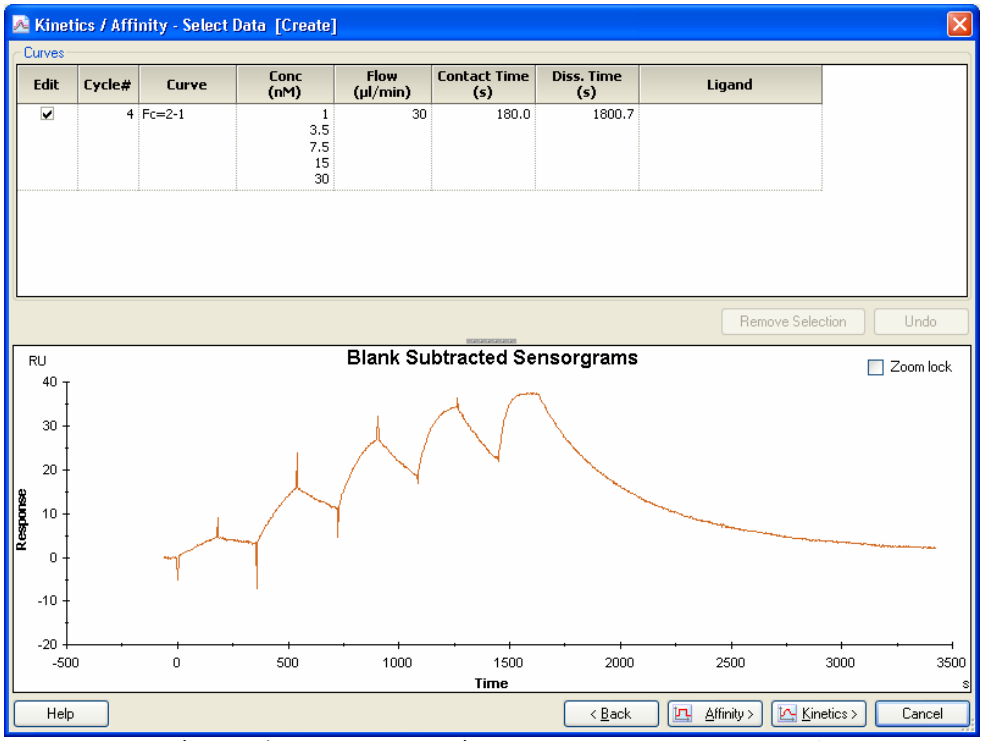
エアーの混入などの理由で、解析データから外したいセンサーグラムがある場合は、そのセンサーグラムについて、テーブル中の **Include** カラムのチェックを外す。



チェックされたセンサーグラムのみ重ね書き表示され、解析される

Next>をクリックする。

↓

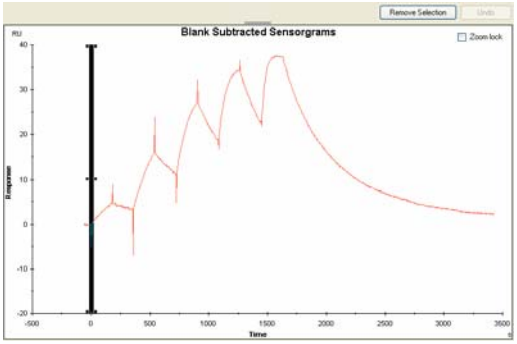


濃度 0 のセンサーグラムが、全センサーグラムから差し引かれる。濃度 0 のセンサーグラムが複数ある場合には、平均したセンサーグラムが差し引かれる。

必要に応じて、データの部分的な削除を行う。補足 3-12.を参照。

補足 3-12. センサーグラムの部分的な削除

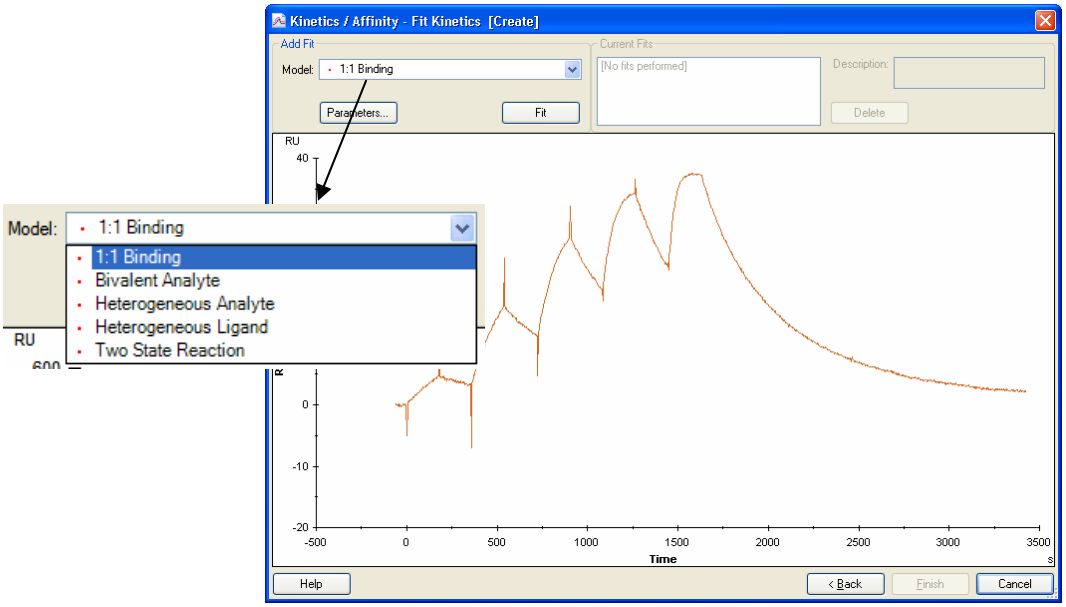
エアーの混入などが理由で、センサーグラム上に削除したい領域がある場合は、マウスの左ボタンをドラッグし、削除したい領域を拡大したのち、マウスの右ボタンをドラッグして、削除領域を選択する。拡大図を解除する場合は、センサーグラムを含まない余白をダブルクリックすると、一つ前の縮小画面に戻る。



領域を選択すると、グラフの右上の **Remove Selection** ボタンがアクティブになる。クリックすると、データが削除される。

Kinetics>をクリックする。

↓



Model:でフィッティングに採用する反応モデルを選択する。をクリックすると、全ての反応モデルが表示される。不明な場合は、1:1 Binding を選択する。反応モデルについては、補足 3-13.を参照。

補足 3-13. 反応モデル

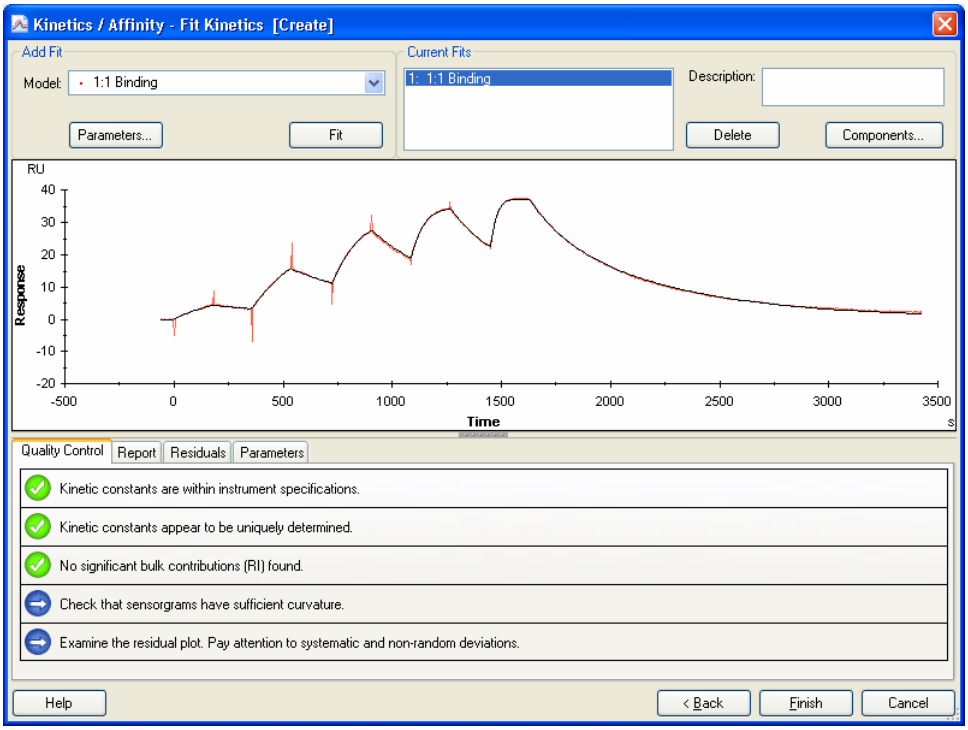
リガンドを B、アナライトを A とする。

- **1:1 Binding**
  リガンドとアナライトが一分子同士で結合する最も単純な反応モデル。
  A + B ⇔ AB
- **Bivalent Analyte**
  アナライトが二価もしくはホモ二量体の反応モデル。AB 複合体形成後、リガンド B が二次的に結合する反応。
  A + B ⇔ AB , AB + B ⇔ AB2
- **Heterogeneous Analyte**
  競合反応モデル。リガンド上の一種類の結合部位を二種類のアナライトが競合する反応。
  A1 + B ⇔ A1B , A2 + B ⇔ A2B
- **Heterogeneous Ligand**
  アナライトに対して親和性の異なる二つの結合部位を持つリガンドにアナライトが並行して結合する反応モデル。
  A + B1 ⇔ AB1 , A + B2 ⇔ AB2
- **Two state Reaction (conformation change)**
  リガンドとアナライトの一分子同士の結合であるが、複合体形成後コンフォメーション変化を起こす反応モデル。
  A + B ⇔ AB ⇔ AB*

選択後、**Fit** をクリックする。

↓

解析結果が表示される。



黒色のセンサーグラムは、フィッティングにより作成されたフィッティングカーブである。

1:1 Binding を選択した場合に限り、センサーグラム下に **Quality Control** テーブルが表示される。

補足 3-14. 解析結果の Quality Control

5 項目の品質評価結果が、ステータスマークで表示される。

ステータスマーク

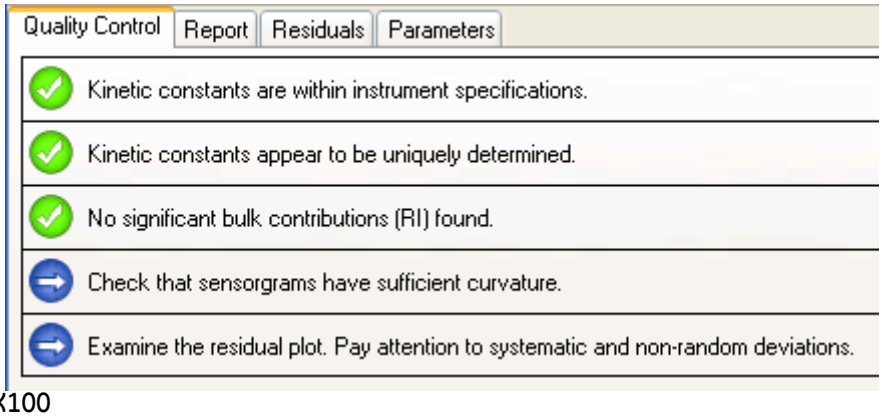
クオリティーアセスメントにパスしている。

クオリティーアセスメントの許容限界に近い。

クオリティーアセスメントにパスしていない。

ニュートラルまたは各自で確認が必要。

品質評価基準



①速度定数はシステムのスペック範囲内か？

スペック範囲　　$k_a = 10^3 \sim 10^7$（1/Ms）、$k_d = 10^{-5} \sim 0.5$(1/s)

②各パラメータは独立して算出されているか？

k_a、 k_d および Rmax について解析結果に与える、パラメータ間の相関性を確認している。顕著な相関性がある場合は良好な結果ではない。

③溶液効果の値（RI）の妥当性は？

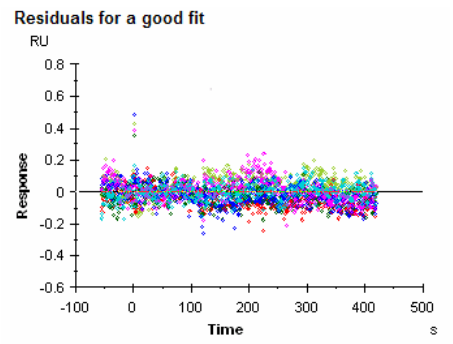
リファレンスセルおよびアナライトのゼロ濃度を差し引いている場合には、RI は限りなくゼロとなるが、結合・解離速度が速くセンサーグラムが箱型の場合には、RI の値が大きく算出され、解析結果へ影響を与える。

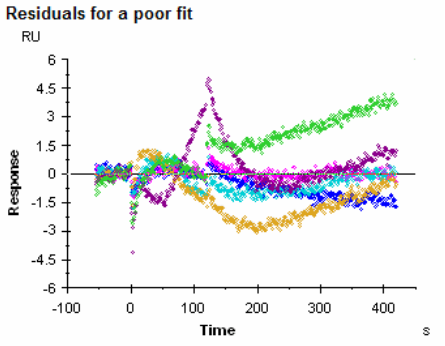
④センサーグラムはカーブを描いているか？

センサーグラムの結合・解離領域が直線的な場合には、良好なフィッティングを行うことができない。

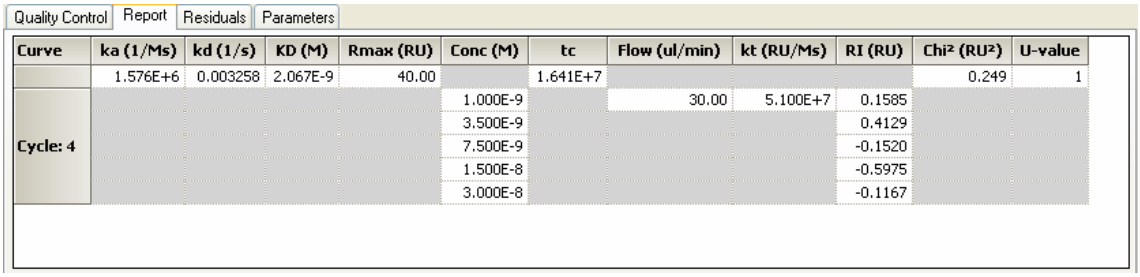
⑤フィッティングカーブに対して測定プロットは、ランダムに分散しているか？

Residuals タブをクリックして、残差プロットを確認する。Y 軸のゼロ近傍で、ランダムにプロットが分散している場合は良好なフィッティングと判断できる。ランダムに分散していない場合には、良好なフィッティング結果ではない。





●Report タブ　　算出された各種パラメータを確認できる。



Curve	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	Conc (M)	tc	Flow (ul/min)	kt (RU/Ms)	RI (RU)	Chi² (RU²)	U-value
	1.576E+6	0.003258	2.067E-9	40.00		1.641E+7				0.249	1
Cycle: 4					1.000E-9		30.00	5.100E+7	0.1585		
					3.500E-9				0.4129		
					7.500E-9				-0.1520		
					1.500E-8				-0.5975		
					3.000E-8				-0.1167		

k_a (1/Ms)	結合速度定数
k_d (1/s)	解離速度定数
K_D(M)	解離定数
Rmax(RU)	アナライトの結合最大量
RI(RU)	溶液効果（bulk effect）
$Chi^2(RU^2)$	カイ二乗

●Residuals タブ　　分散プロットが確認できる。

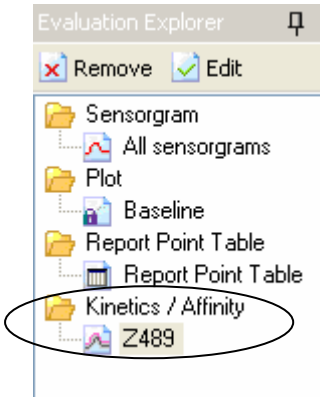
●Parameters タブ　　各解析値のスタンダードエラーが確認できる。

（再解析を行う場合には、引き続き解析を行う。補足 3-16.（81 ページ）を参照。）

Finish をクリックする。

↓

解析結果は、画面左端の Evaluation Explorer 中のフォルダーに追加保存される。ファイル名は自動的にアナライト名が採用される。



引き続き、同時に測定した別のアナライトについて解析する場合は、ツールバーの

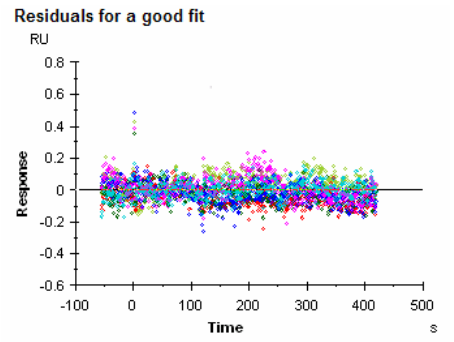
をクリックする。

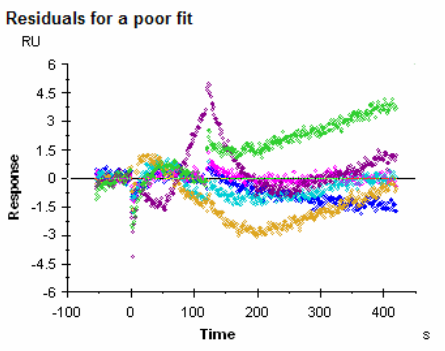
補足 3-15. フィッティング結果の評価

フィッティングが良好な場合、センサーグラムとフィッティングによって得られたフィッティングカーブがほぼ重なる。特に、センサーグラムの傾きが大きく異なる場合、フィッティングは良好ではないと判断する。また、解析結果の RI 値が 0(RU)に近いか確認する。
統計学的には、以下の各項目を確認する。

Residual

Residuals タブをクリックして、残差プロットを確認する。Y 軸のゼロ近傍で、ランダムにプロットが分散している場合は良好なフィッティングと判断できる。





Chi² 値

測定データとフィッティングカーブ間の差を示す。良好なフィッティングでは、シグナルノイズの平均平方値に一致する。

U-value

解析値が信頼できるか否かを判断する値。15 以下であれば問題ない。25 以上の場合には、算出された値の信頼性は低い。

SE (Standard error)

Parameters タブをクリックすると、各パラメータについて SE（標準誤差）が表示される。各パラメータの解析結果に対して、SE の値が 10%以下であれば問題ない。

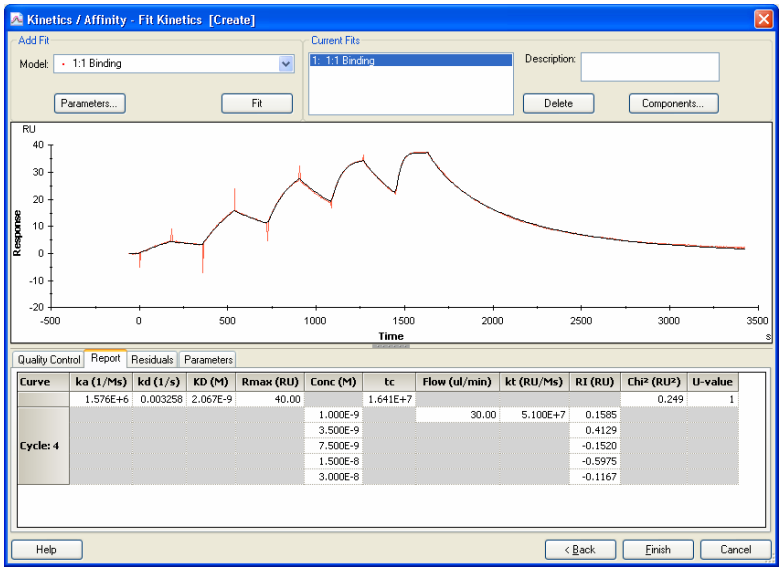
フィッティングが良好ではない要因
①フィッティングに採用したモデルが異なっている
②箱型のセンサーグラムである
③経時的なリガンドの活性低下が考えられる
④再生が不十分である
⑤アナライト濃度の調製ミスが考えられる　等

①が要因と考えられる場合は、再度妥当な反応モデルを選択し解析する。
②が要因の場合、解析結果の RI がセンサーグラムのレスポンスの大半を占める値になることがある。これは、結合解離領域の急激なレスポンスの変動を RI とみなしてしまうからである。この場合は、RI=0（Constant）として、再解析する必要がある。

複数濃度のセンサーグラムから 1 つの定数を算出する解析方法では、すべての濃度のセンサーグラムにおいて k_a, k_d, Rmax が同一のパラメータであることが前提となる。しかし、上記③～⑤の実験状況では、各濃度のセンサーグラムにおいて、これらのパラメータは必ずしも一致しない。
例えば、Rmax は、リガンドに対するアナライトの最大結合量（RU）であり、理想的な実験系では、連続して同一セルを使用している限り、どの濃度のセンサーグラムに対しても同一値である。ところが、リガンドの再生が不十分な場合や、再生操作によりリガンドの活性がサイクル毎に低下している場合には、Rmax はサイクル毎に低下する。フィッティングが良好でない要因が、測定結果から明らかに Rmax にある場合は、Rmax が同一パラメータであることを解除し再解析する。

補足 3-16. カーブフィッティングにおける再解析

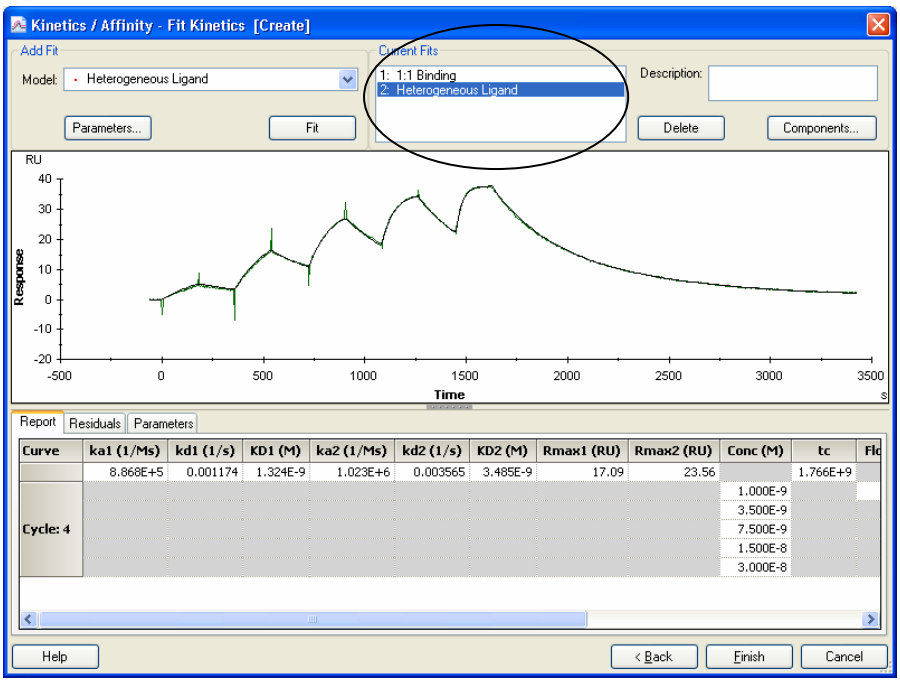
反応モデルの変更



反応モデルを変更し再解析する場合は、**Finish** をクリックせず、**Add Fit** ボックスの **Model:** 右側の ▼ をクリックし、新しい反応モデルを選択する。**Fit** をクリックする。

↓

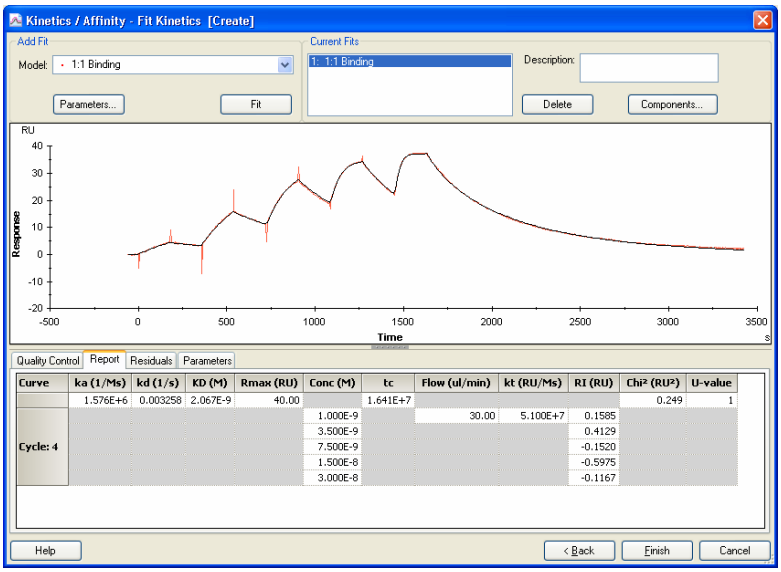
新しい解析結果が表示される。



解析したすべての結果は、履歴として、**Current Fits** ボックスに残る。

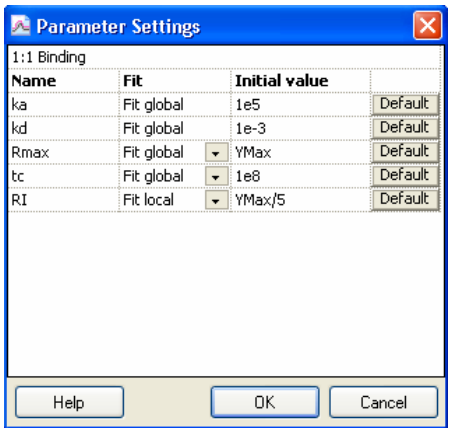
前の解析結果を見る場合は、**Current Fits** ボックスの目的の反応モデルをクリックすると結果が表示される。終了後、**Finish** をクリックする。

解析パラメータの解析設定条件の変更



解析パラメータ（Rmax,RI）の解析設定条件を変更し再解析する場合は、**Add Fit** ボックスの **Parameters** をクリックする。

↓



経時的なリガンドの活性低下や、マルチサイクル法において、再生の不十分さが原因で、全センサーグラムにおいて、Rmax を同一パラメータとみなせない場合、Rmax の行の Fit カラムの▼をクリックし、Fit local を選択する。

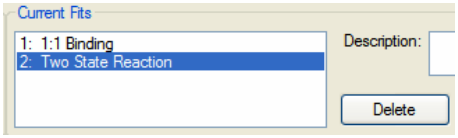
箱型のセンサーグラムを解析する際に、濃度 0 のセンサーグラムを差し引いているにもかかわらず、センサーグラムの急激なレスポンスの変化を RI としてみなしてしまう場合、RI の Fit カラムの▼をクリックし、Constant を選択する。Initial value は自動的に 0 が入力される。

Parameter Setting ダイアログ中の **OK** をクリックすると、条件が適用される。

引き続き、Fit をクリックすると解析結果が表示される。

補足 3-17. 解析履歴からの結果の消去

任意の解析結果を履歴から消去する場合は、**Current Fits** ボックス中の目的のデータを選択する。



Delete をクリックする。

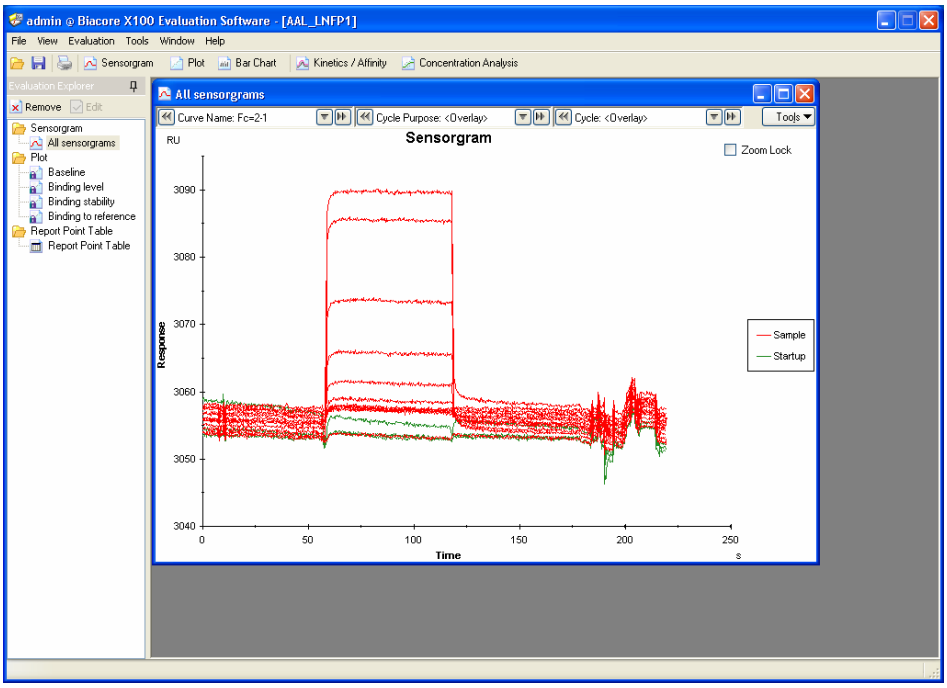
↓

確認ダイアログが表示される。
消去する場合は **OK** をクリックする。

↓

解析結果が **Current Fits** ボックスから消去される。

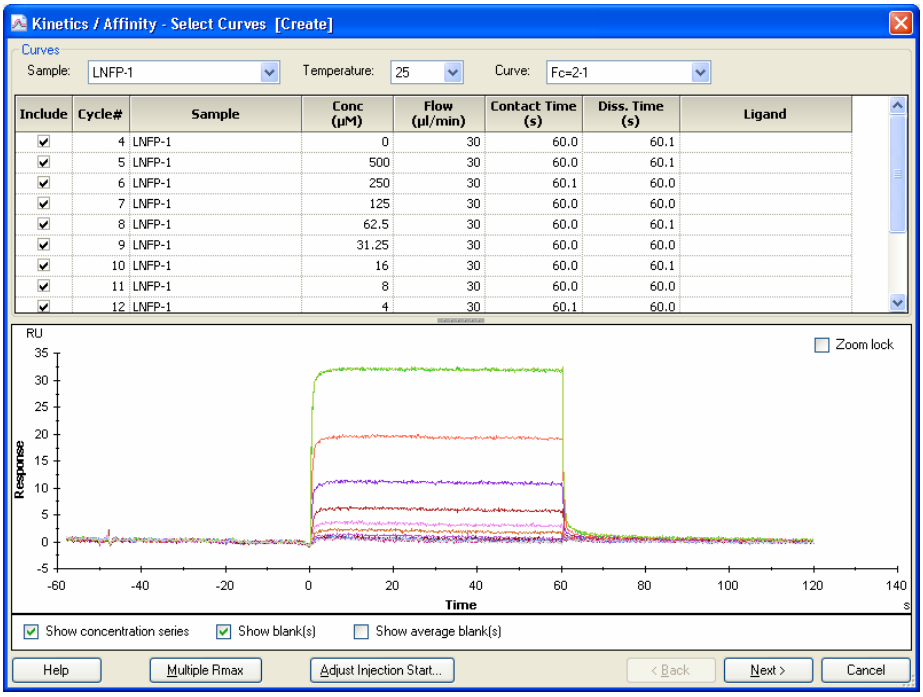
3-7-2. 平衡値解析



ツールバーの Kinetics / Affinity をクリックする。(サンプル情報の入力ミスがあった場合には、予め変更を行う。補足 3-10.（72 ページ）を参照。)

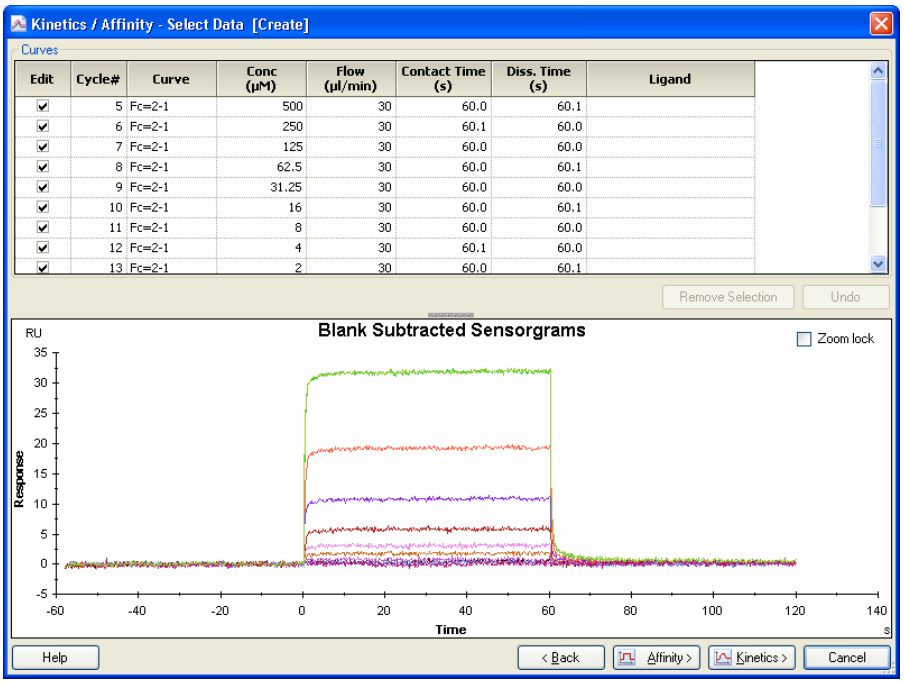
↓

同一アナライト名のセンサーグラムが重ね書き表示される。



必要に応じて、センサーグラムの削除を行う。補足 3-11.（73 ページ）を参照。**Next>**をクリックする。

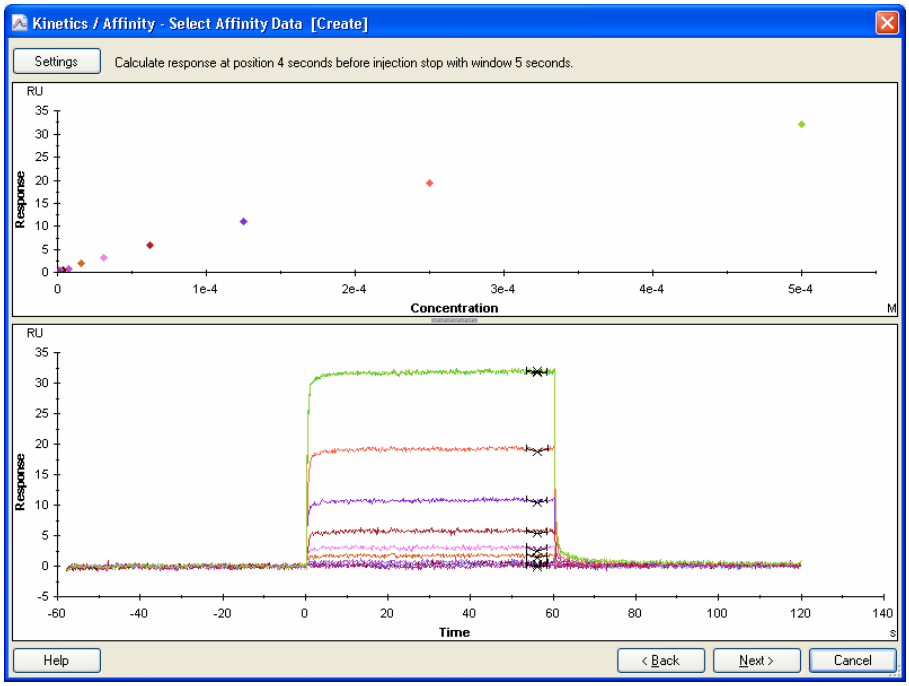
↓



濃度 0 のセンサーグラムが、全センサーグラムから差し引かれる。

Affinity>をクリックする。

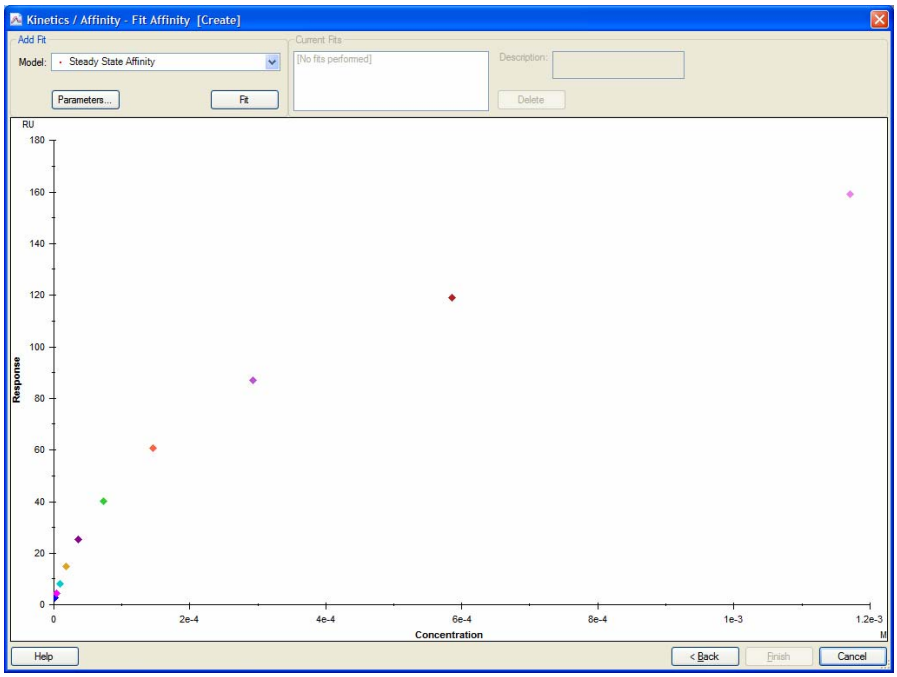
↓



アナライト添加終了直前のレスポンス（RU）を平衡値（Req 値）（RU）とし、各アナライト濃度における Req 値がプロットされる。

Next>をクリックする。

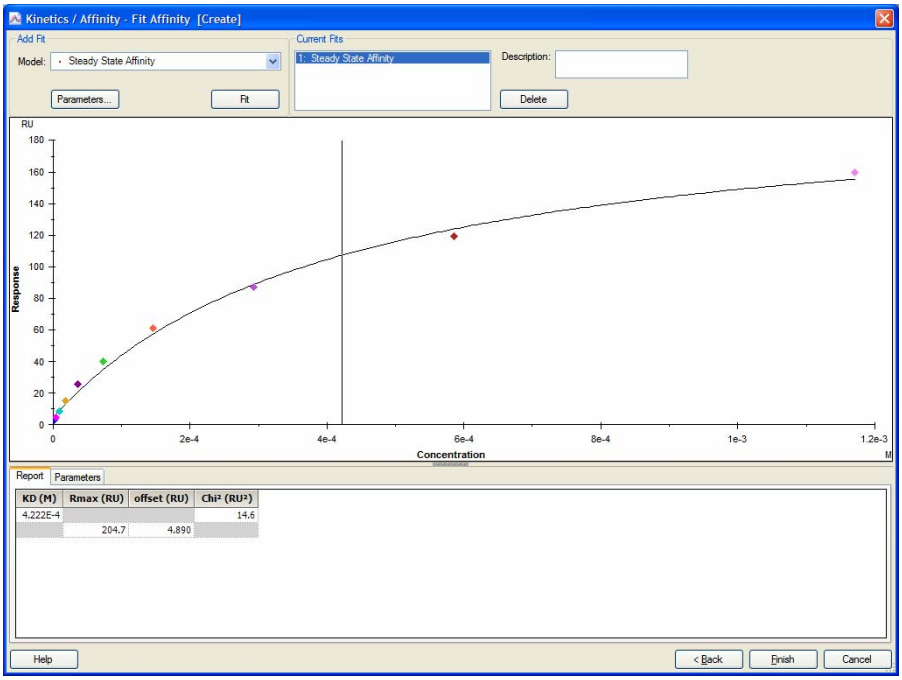
↓



Fit Affinity ダイアログが表示される。**Model** は、Steady State Affinity が自動選択される。

Fit をクリックする。

↓



●Report タブ　　解析結果が表示される。

K_D(M)　　解離定数

Rmax(RU)　　アナライトの最大結合量

offset(RU)	溶液効果（bulk effect）
$Chi^2(RU^2)$	カイ二乗

●**Parameters** タブ　解析に利用した各種パラメータの確認が可能。

終了後、**Finish** をクリックする。

↓

Evaluation Explorer ウインドウの Kinetics/Affinity フォルダーに、解析結果が追加される。
ファイル名は、アナライト名が自動入力される。

↓

引き続き、同時に測定した別のアナライトについて解析する場合は、ツールバーの

をクリックする。

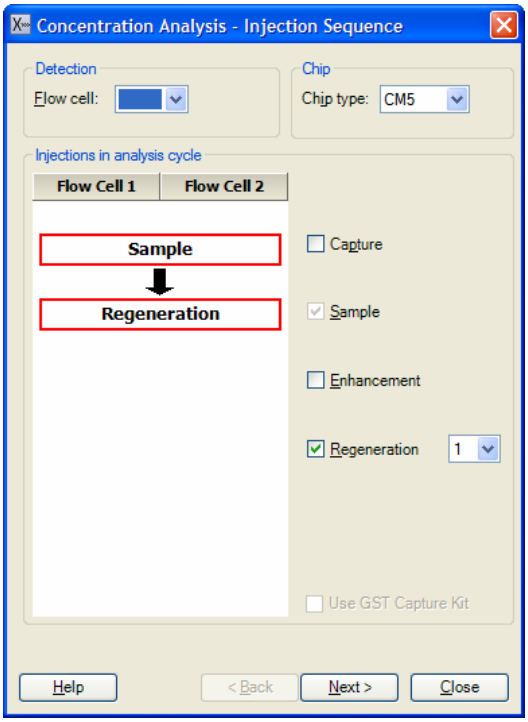
4. 濃度測定

4-1. 濃度測定の実行および解析

濃度測定は、Concentration Analysis ウィザードを使用する。対応するワークフローは存在しないが、再生条件の検討まではどの実験系も同じであるため、Binding Analysis...または Kinetics/Affinity...のワークフローを代用できる。ワークフローは、Overview で条件検討の結果を一覧で表示できるメリットがある。ここでは、濃度測定の実行について説明する。
濃度測定の概念は、D-3.（XII ページ）を参照。

Other options（ ）→ **Wizards...** → **Concentration Analysis** をクリックする。

↓



Injection Sequence ダイアログが表示される。

Detection・・・

Flow cell :　リガンドが固定化されているフローセルを選択する。

Chip・・・

Chip type :　センサーチップの種類を選択する。

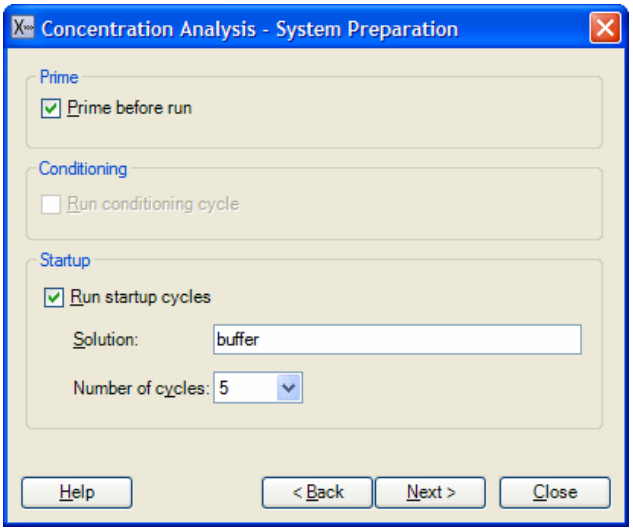
Injections in analysis cycle・・・

Capture :　リガンドをキャプチャーする場合はチェックを入れる。

Enhancement :　アナライトの結合量が少なく、二次抗体などを利用して結合量を増幅する場合は、チェックを入れる。

Next>をクリックする。

↓



Prime・・・

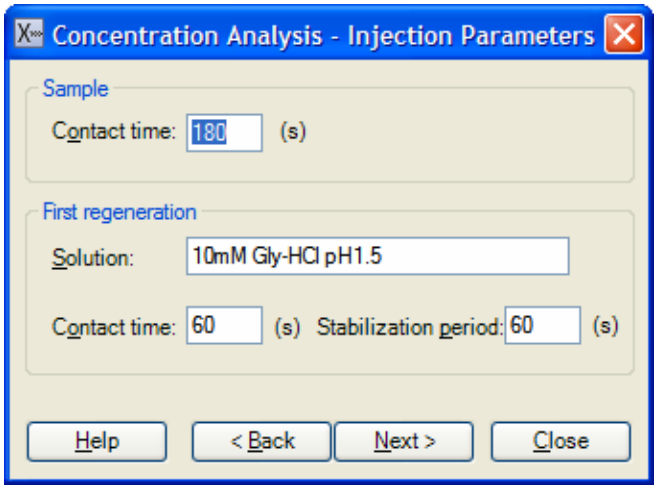
Prime before run：　測定前に Prime を実行する場合は、チェックを入れる。

Startup・・・

Run startup cycles：　アナライト測定前のダミーランの設定。少なくとも、3 回は実施する。通常、ランニング緩衝液を使用する。

Next>をクリックする。

↓



Injection Parameters ダイアログが表示される。

Sample・・・

Contact time:　アナライト添加時間（秒）

First regeneration・・・

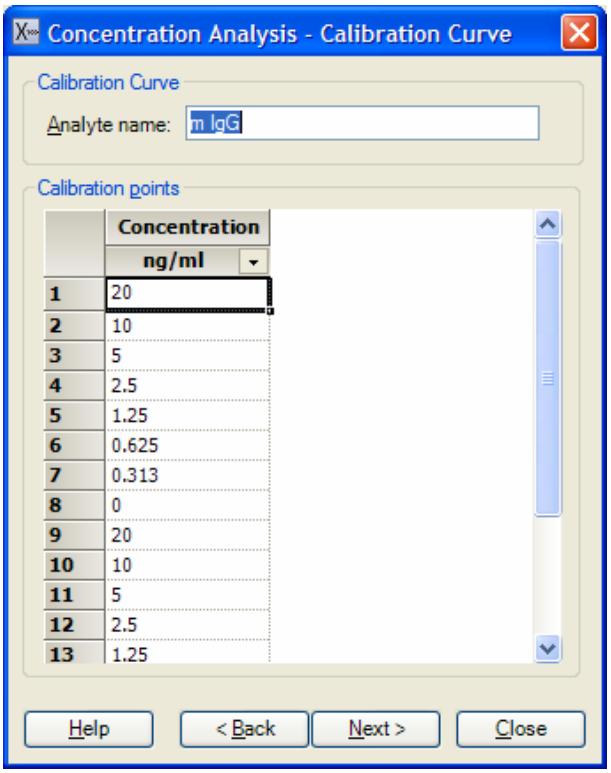
Solution:　再生溶液名

Contact time:　再生溶液添加時間（秒）

Stabilization period：　　再生溶液添加後のベースライン安定化時間（秒）

Next>をクリックする。

↓



Calibration Curve ダイアログが表示される。

Calibration Curve ・・・

Analyte name:　　検量線用アナライト（濃度既知標準サンプル）名

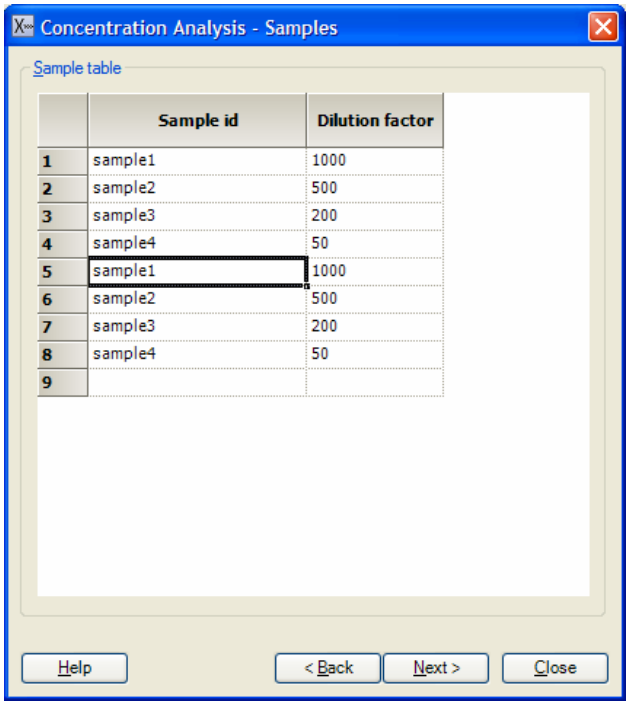
Calibration points・・・

Concentration :　　テーブルに、検量線用アナライトの濃度を入力する。 をクリックすると、濃度単位の変更が可能。少なくとも、6 濃度以上測定する。

検量線を複数作成する際には、テーブルの濃度系列をドラックして選択し、コピー、ペーストする。テーブルに入力した順番で測定される。

Next>をクリックする。

↓



Samples ダイアログが表示される。

Sample table・・・

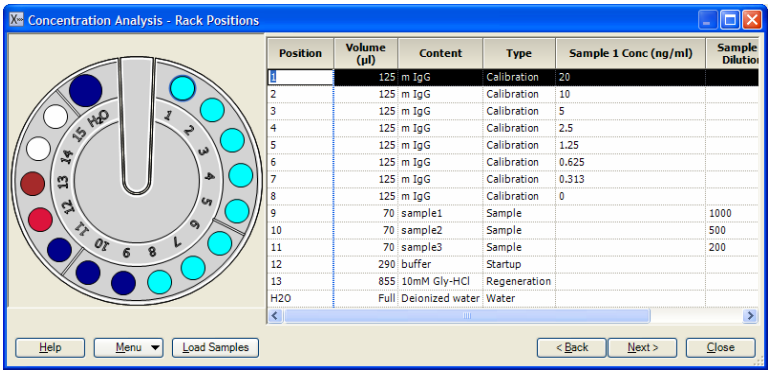
Sample id :　　アナライト（濃度未知サンプル）名

Dilution factor :　　アナライト希釈倍率

繰り返し測定を行う場合には、同一アナライト名を繰り返し測定回数分入力する。なお、検量線用アナライトの測定後に、テーブルに入力した順番で濃度未知のアナライト測定を行う。

Next>をクリックする。

↓



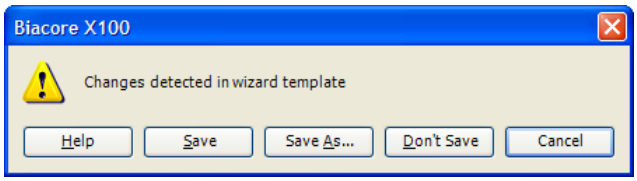
Rack Positions ダイアログが表示される。テーブルに従いサンプルをラックにセットする。

Next>をクリックする。

↓

確認後、**Start** をクリックする。

↓



アナライト情報を入力したウィザードをテンプレートとして保存するか聞かれる。必要があれば、Save As...で名前を付けて保存を行う。保存しない場合は、Don't Save をクリックする。

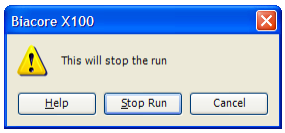
↓

結果の保存先とファイル名を指定後、**Save** をクリックする。測定を緊急停止したい場合は、補足 4-1.を参照。

補足 4-1. 測定の緊急停止

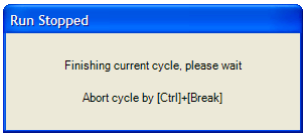
測定中に緊急停止させる場合、ツールバーの **Run** → **Stop Run...**をクリックする。

↓



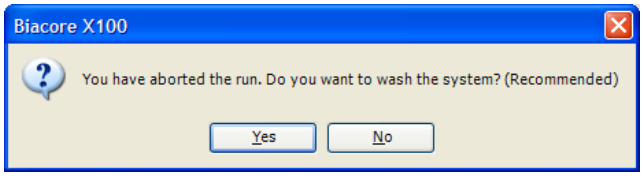
Stop Run をクリックする。

↓



測定中サイクルの全コマンドを実行後、**Standby** 状態になる。
全コマンド実行を待たずに測定を中止したい場合には、キーボードの "Ctrl" キーと "Break" キーを同時に押す。

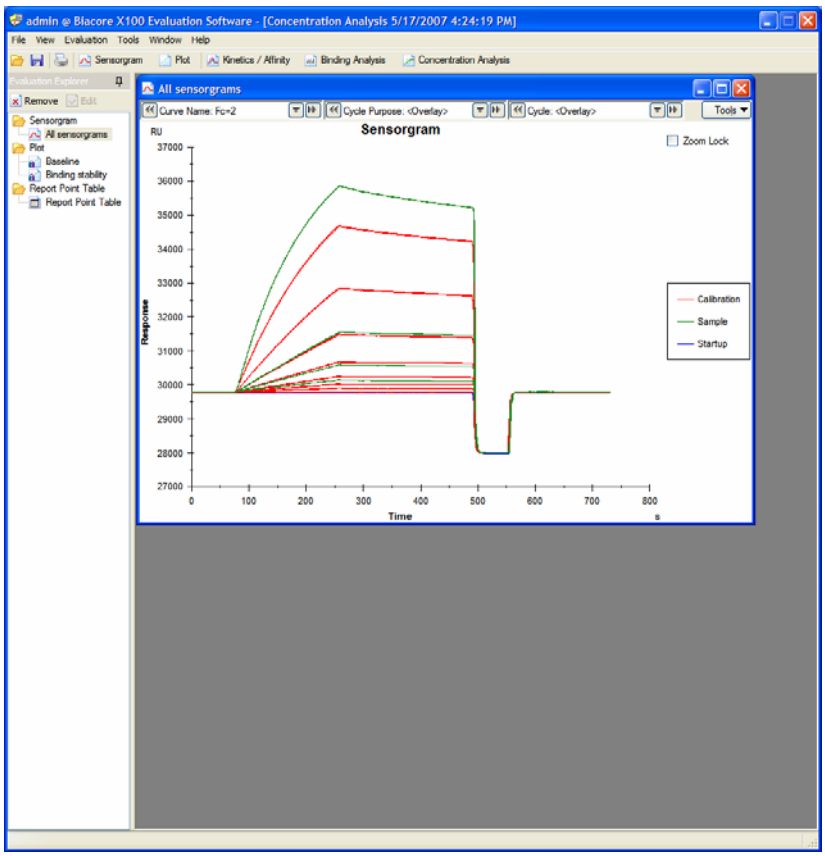
↓



装置の洗浄を行う場合には、**Yes** をクリックする。洗浄後停止する。

↓

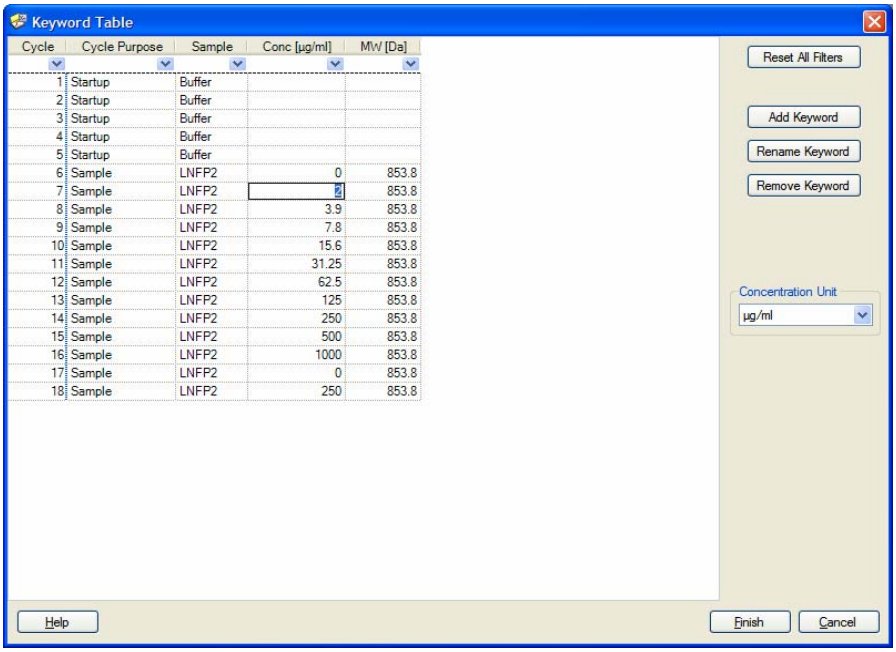
測定が終了すると、装置は **Standby** 状態になる。取得データは自動保存され、解析に向け Biacore X100 Evaluation Software で開かれる。



Biacore X100 Evaluation Software のツールバーの Concentration Analysis をクリックする。
(アナライト情報等の入力ミスがあった場合には変更を行う。補足 4-2.を参照。)

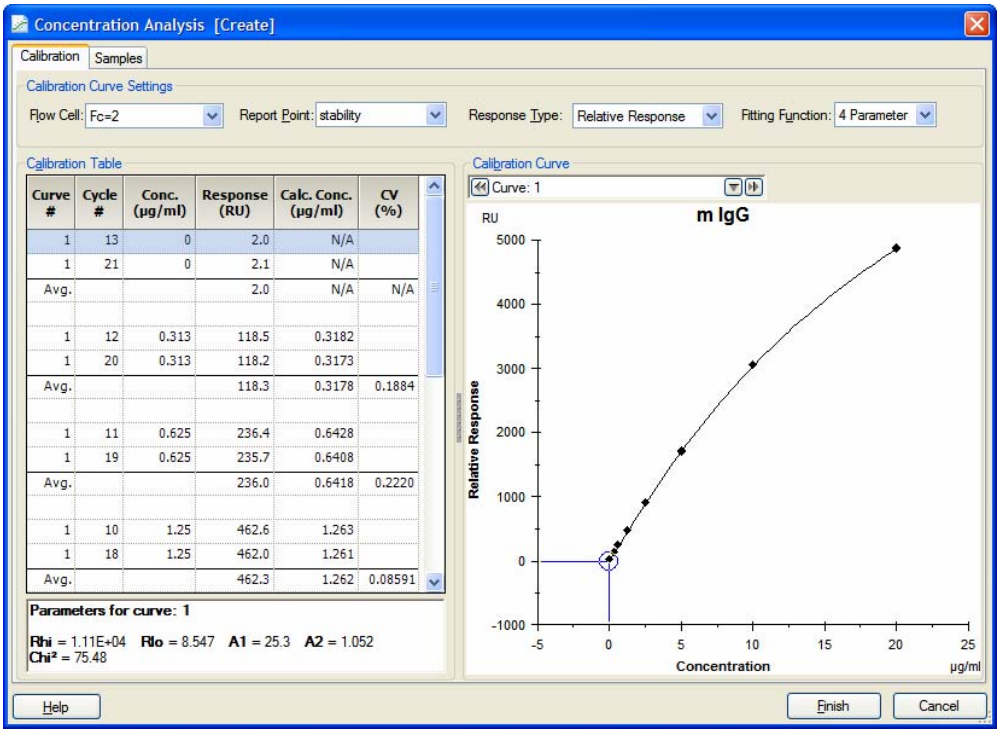
補足 4-2. アナライト情報の変更

アナライト濃度、濃度単位、アナライト名などの入力ミスがあった場合は、**Keyword Table** から入力を変更する。**Tools...** → **Keyword Table...**をクリックする。



各セルをクリックして、変更を行う。

↓


Concentration Analysis [Create]
Calibration
Samples
Calibration Curve Settings
Flow Cell: Fc=2
Report Point: stability
Response Type: Relative Response
Fitting Function: 4 Parameter
Calibration Table
Curve # | Cycle # | Conc. (µg/ml) | Response (RU) | Calc. Conc. (µg/ml) | CV (%)
1 | 13 | 0 | 2.0 | N/A |
1 | 21 | 0 | 2.1 | N/A |
Avg. | | | 2.0 | N/A | N/A
1 | 12 | 0.313 | 118.5 | 0.3182 |
1 | 20 | 0.313 | 118.2 | 0.3173 |
Avg. | | | 118.3 | 0.3178 | 0.1884
1 | 11 | 0.625 | 236.4 | 0.6428 |
1 | 19 | 0.625 | 235.7 | 0.6408 |
Avg. | | | 236.0 | 0.6418 | 0.2220
1 | 10 | 1.25 | 462.6 | 1.263 |
1 | 18 | 1.25 | 462.0 | 1.261 |
Avg. | | | 462.3 | 1.262 | 0.08591
Parameters for curve: 1
Rhi = 1.11E+04 Rlo = 8.547 A1 = 25.3 A2 = 1.052
Chi² = 75.48
Calibration Curve
Curve: 1
m IgG
RU
Relative Response
Concentration
µg/ml
Help
Finish
Cancel

Calibration Curve Settings・・・

Flow cell : 評価に利用するセンサーグラムの選択を行う。

Report Point : 評価に利用するレポートポイントを選択する。初期設定では stability が自動選択されている。レポートポイントの追加を行う場合には補足 4-3.を参照。

Response Type : 濃度定量にレポートポイントの結合レスポンスを採用するか、傾きを採用するかを選択する。通常は、結合レスポンスの Relative Response を選択。

Fitting Function : 検量線のフィッティング方法を選択。“4-Parameter”または“Linear”から選択。通常、4-Parameter を選択。

Calibration Table・・・

Curve # : 検量線番号

Cycle# : 測定サイクル番号

Conc. : 標準サンプルの“入力”濃度

Response(RU) : 結合量

Calc.Conc. : 標準サンプルの“検量線から算出された”濃度

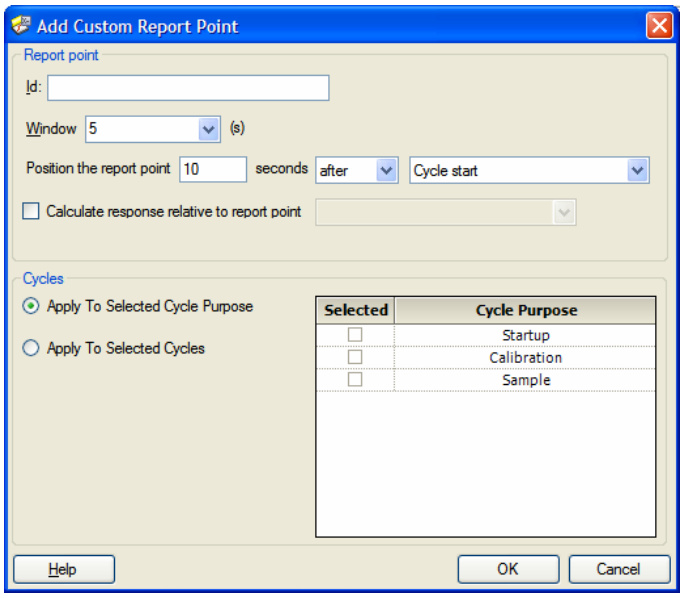
CV(%) : Calc.Conc.の変動係数
繰り返し測定を行うと算出される

補足 4-3. レポートポイントの追加

Report Point の stability は、アナライト添加終了の 20 秒後に自動設定されている。stability 以外のレポートポイントを追加したい場合には、ツールバー → **Custom Report Points...** をクリックする。

Add...をクリックする。

↓



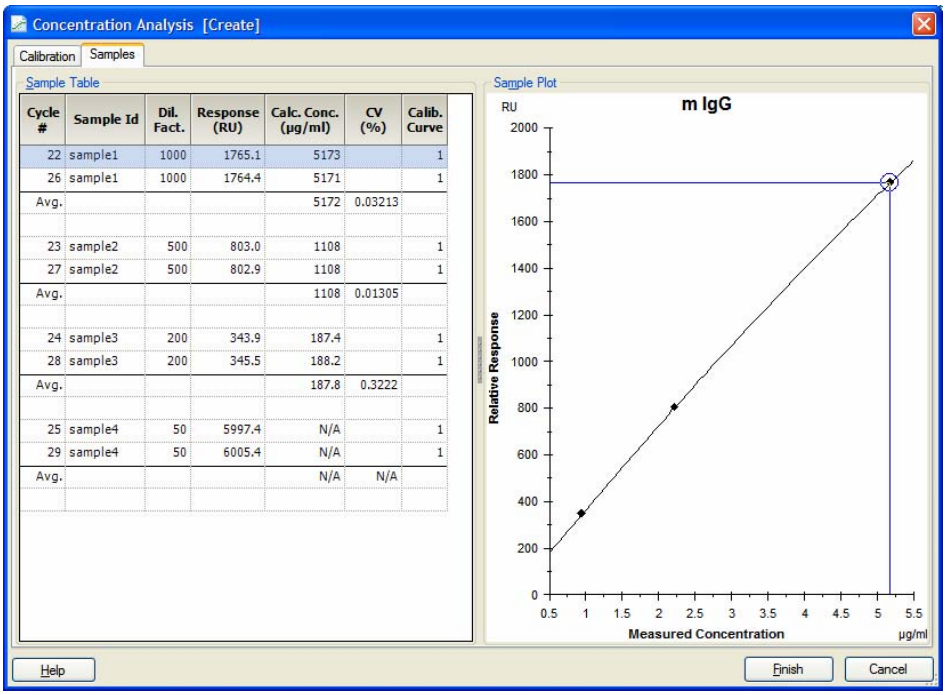
Id：にレポートポイント名を入力し、追加したいレポートポイントの位置を設定する。
Cycles で、レポートポイントを追加するセンサーグラムを指定する。

補足 4-4. 測定サイクルの削除

Calibration Table で削除したいサイクルのカラムをクリックする。マウスの右クリックを押し、**Exclude Cycle** を選択する。選択したサイクルを除いて、再度フィッティングを行う。再度、マウスの右クリックを押して、**Import Cycle** をクリックすると追加可能。

Samples タブをクリックする。

↓



Cycle #	Sample Id	Dil. Fact.	Response (RU)	Calc. Conc. (µg/ml)	CV (%)	Calib. Curve
22	sample1	1000	1765.1	5173		1
26	sample1	1000	1764.4	5171		1
Avg.				5172	0.03213	
23	sample2	500	803.0	1108		1
27	sample2	500	802.9	1108		1
Avg.				1108	0.01305	
24	sample3	200	343.9	187.4		1
28	sample3	200	345.5	188.2		1
Avg.				187.8	0.3222	
25	sample4	50	5997.4	N/A		1
29	sample4	50	6005.4	N/A		1
Avg.				N/A	N/A	

Sample Table・・・

Cycle# :　測定サイクル番号

Sample id. :　アナライト（濃度未知サンプル）名

Dil. Fact. :　希釈倍率

Response(RU) :　結合量

Calc.Conc. :　検量線から“算出された濃度

検量線から外れている場合には、N/A と表示

CV(%) :　Calc.Conc.の変動係数

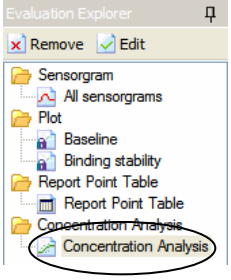
繰り返し測定を行った際に算出される

Calib. Curve. :　濃度計算に利用した検量線番号

Finish をクリックする。

↓

上記解析結果は、画面左端の Evaluation Explorer 中のフォルダーに追加保存される。

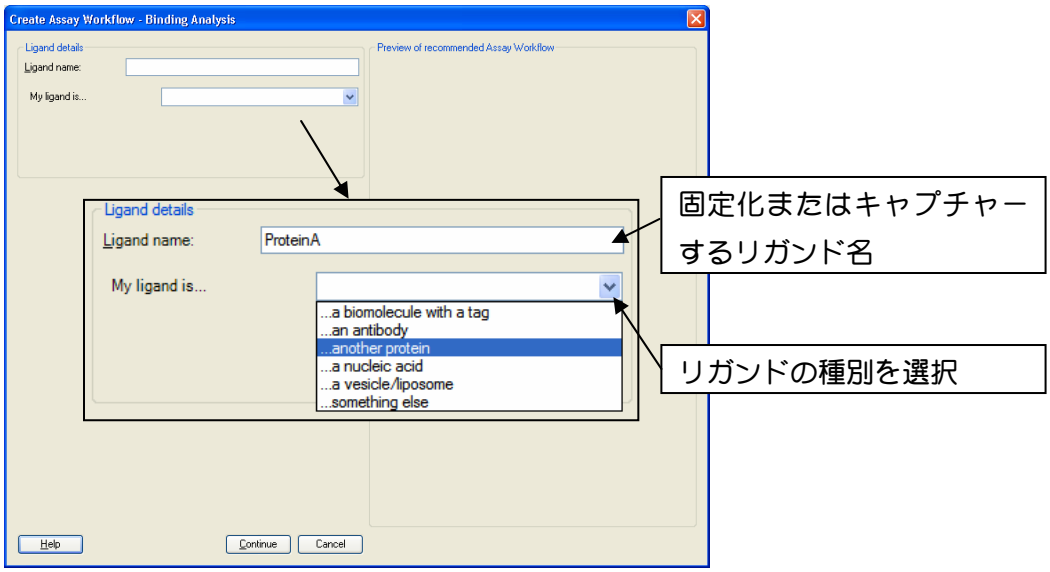


5. 結合の有無の確認、スクリーニング

5-1. ワークフローの作成

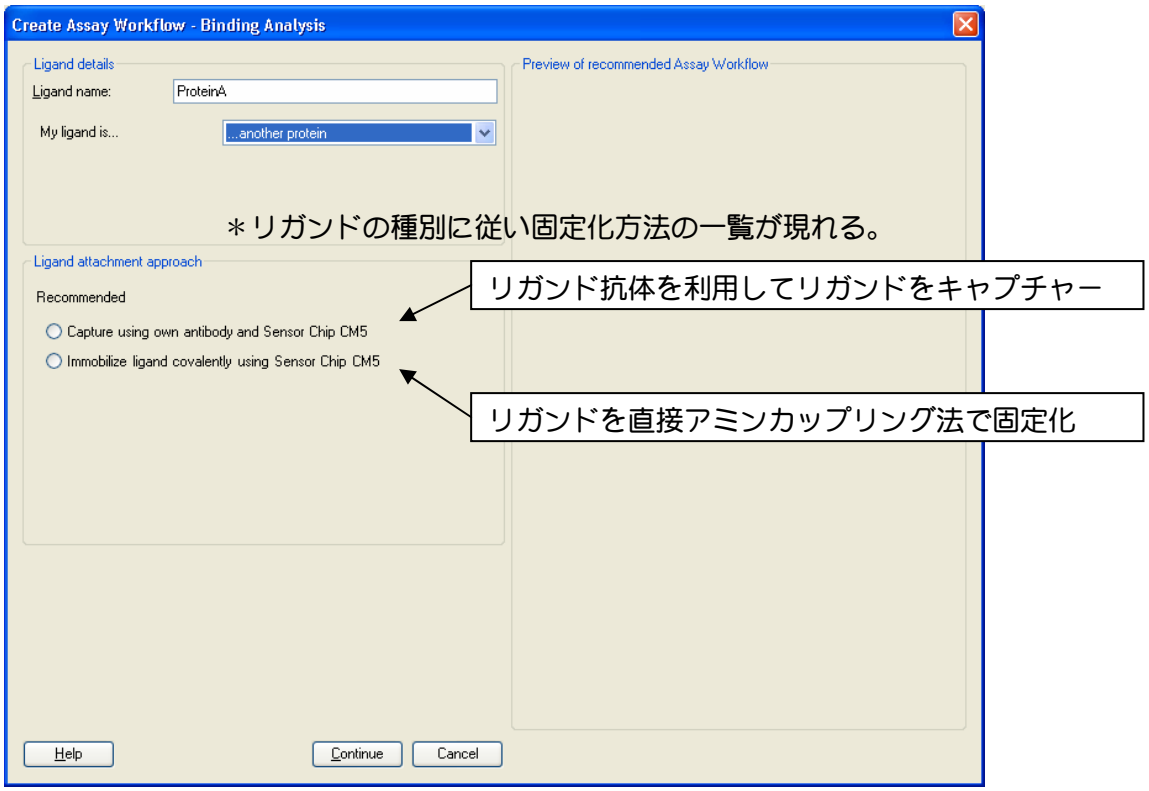
結合解析を行う際には、**Create Assay Workflow** の、**Binding Analysis...**を選択する。

↓



↓

Binding Analysis のダイアログが表示される。



補足 5-1. キャプチャー法によるリガンドの固定化

リガンドを、予めチップ上に固定化したキャプチャー分子によって、サイクル毎にセンサーチップ上に捕捉させる方法をキャプチャー法と呼ぶ。

ワークフロー作成の、"Ligand details"の"My ligand is..."で、以下のリガンドの種別を選択すると、"Ligand attachement approach"に推奨する固定化方法が表示される。

・...a biomolecule with a tag

My ligand is tagged with... （リガンドのタグ名）	推奨固定化法
...biotin	・Sensor Chip SA に固定化
...GST	・抗 GST 抗体によるキャプチャー （GST capture kit, BR-1002-23 ）
...his	・Sensor Chip NTA に固定化
...another tag	・抗タグ抗体によるキャプチャー ・直接固定化

・...an antibody

My antibody is ...（抗体の種別）	推奨固定化法
...a mouse antibody	・抗マウス抗体によるキャプチャー （ Mouse Antibody Capture Kit, BR-1008-38 ）
...a human antibody	・抗ヒト抗体によるキャプチャー （ Human Antibody Capture Kit, BR-1008-39 ）
...another antibody	・抗体認識抗体によるキャプチャー ・直接固定化

・...another protein

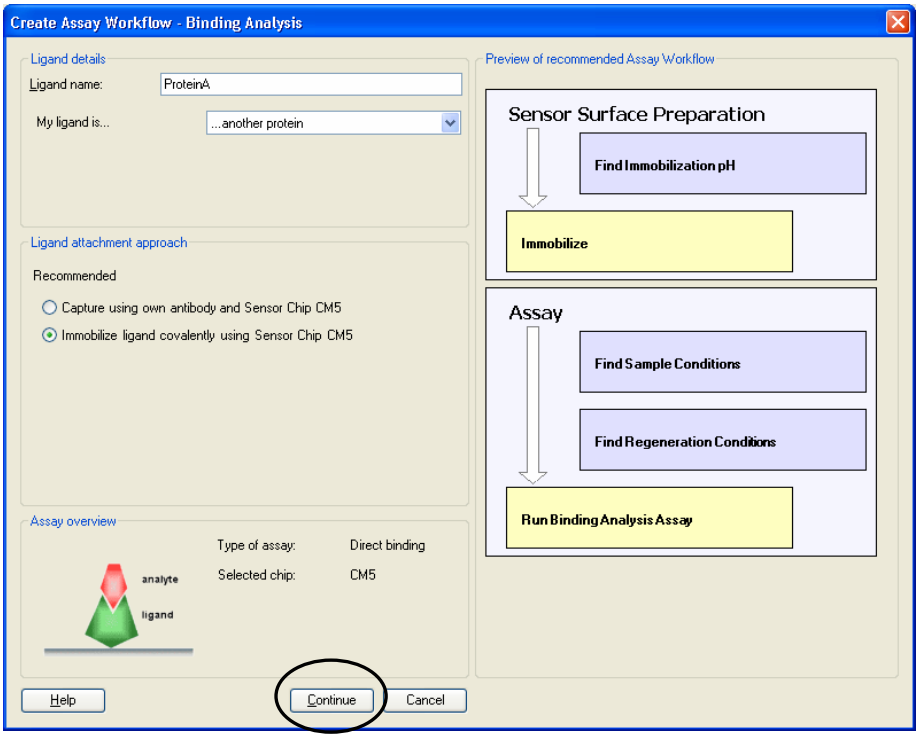
リガンド認識抗体によるキャプチャーまたは直接固定化

キャプチャーキットを利用する場合には、キャプチャー分子の固定化の条件検討の必要がない。添付説明書に従い、Immobilize ウィザードで固定化を行う。キャプチャーキット以外のキャプチャー分子の固定化を行う場合には、、直接リガンドを固定化する場合と同様に条件検討が必要となる。

なお、キャプチャー分子は、フローセル 1 および 2 に固定化を行う。ウィザードでは、自動的にフローセル 1, 2 に固定化する設定となっている。

ここでは、**Immobilize ligand covalently using Sensor Chip CM5** を選択する。

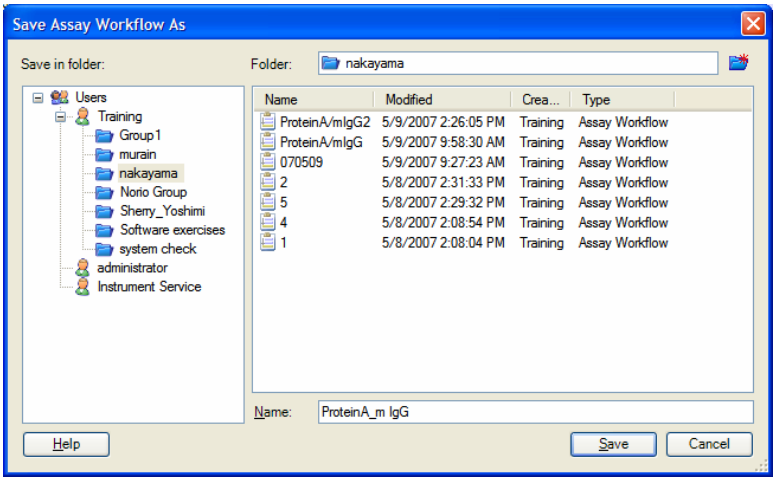
↓



ダイアログ左下に **Ligand attachment overview**、右側に、**Preview of recommended Assay Workflow** が現れる。測定の流れを確認する。

Continue をクリックする。

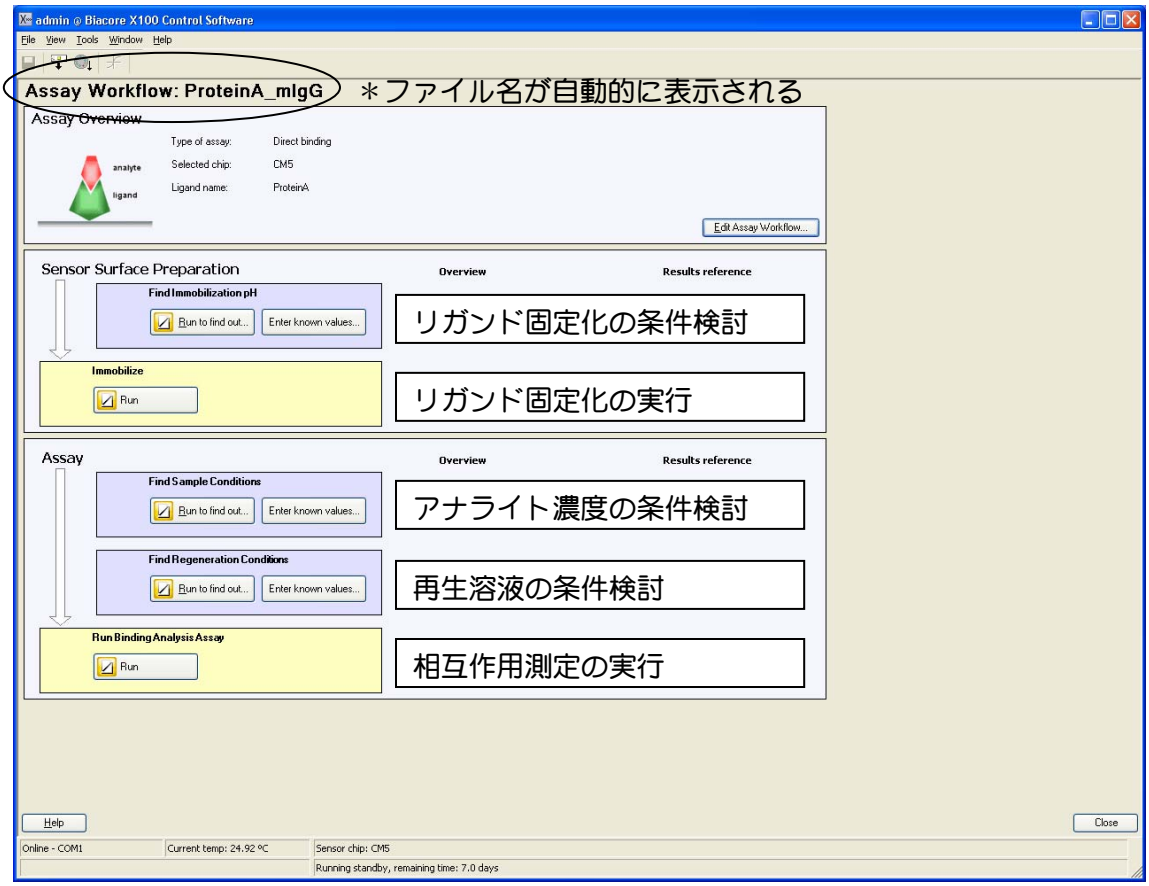
↓



ワークフローの保存先を指定する。

ワークフローを保存すると、その後、このワークフロー上で実施した試験結果等を紐付けして記録される。

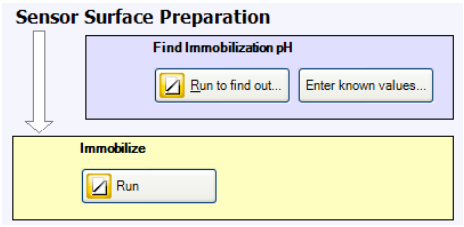
↓



すべてのステップにおいて、**Run to find out...**もしくは **Run** から、対応するウィザードを呼び出して実行する。得られた結果は、**Overview** に表示され、**Results reference** からデータを見ることが出来る。条件検討のステップで、すでに条件が分かっている場合は、**Enter known values...**から条件を入力すると、**Overview** に表示される。

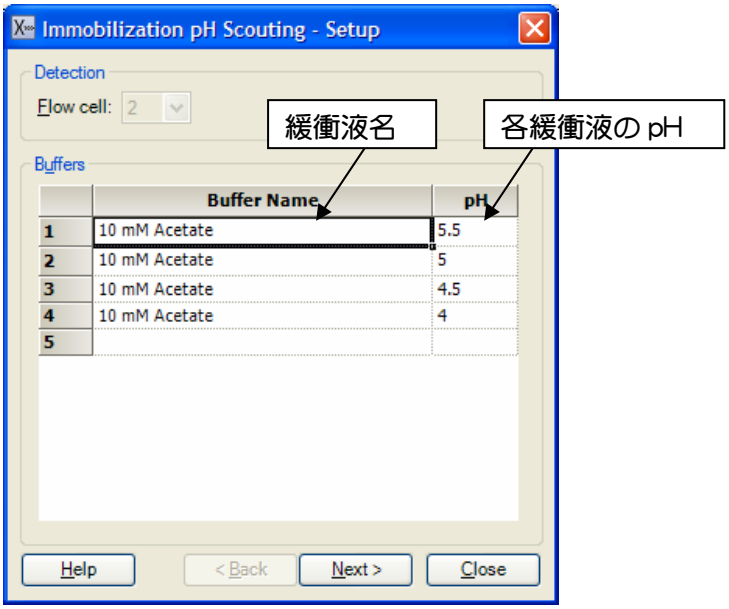
5-2. リガンド希釈液の pH 選択の実行

リガンド希釈液の pH 選択の詳細については、C-2.（VI ページ）を参照。
ワークフローの **Sensor Surface Preparation** のウィザードを実行する。



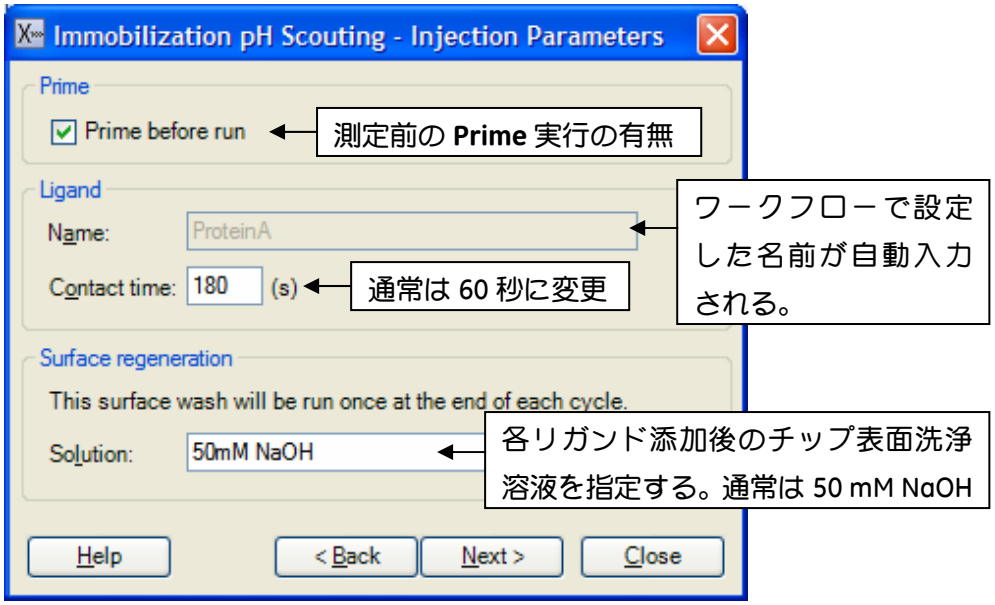
↓

Find Immobilization pH の Run to find out...をクリックする。（既に固定化緩衝液が決まっている場合には、**Enter known values...**をクリックして、条件を入力する。）



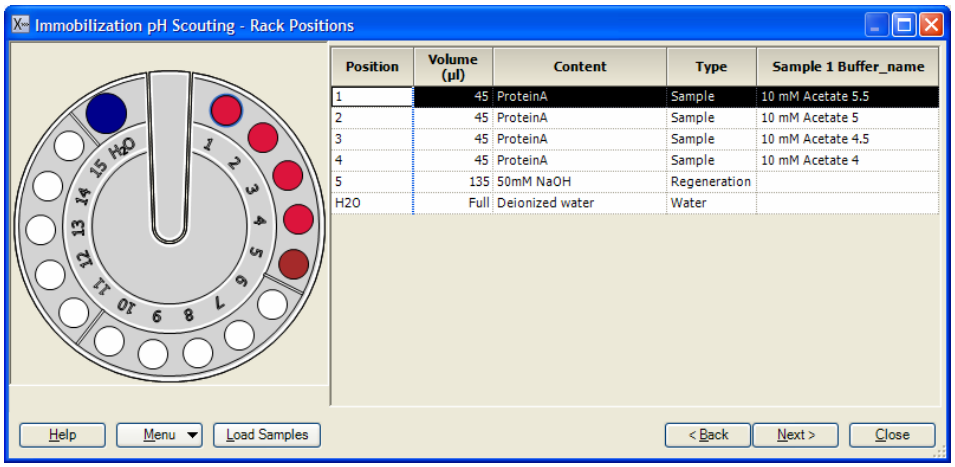
必要に応じ、緩衝液名および緩衝液の pH を変更する。また、削除および追加設定も可能。
Next>をクリックする。

↓



Next>をクリックする。

↓



Rack Positions ダイアログが表示される。テーブルに従いサンプルをラックにセットする。**Next>**をクリックする。

↓

確認画面が表示される。確認後、**Start** をクリックする。

↓

結果の保存先とファイル名を指定後、**Save** をクリックする。緊急停止をする場合は、補足 5-2.（104 ページ）を参照。

↓

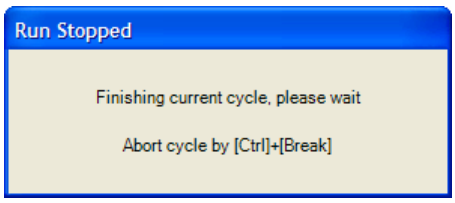
補足 5-2. 測定の緊急停止

測定中に緊急停止させる場合、ツールバーの **Run** → **Stop Run...**をクリックする。

↓

Stop Run をクリックする。

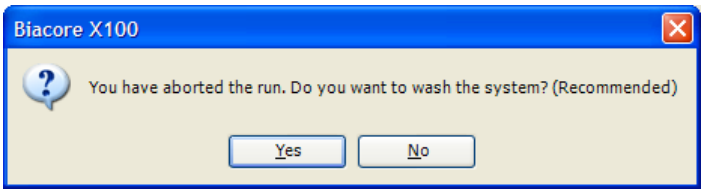
↓



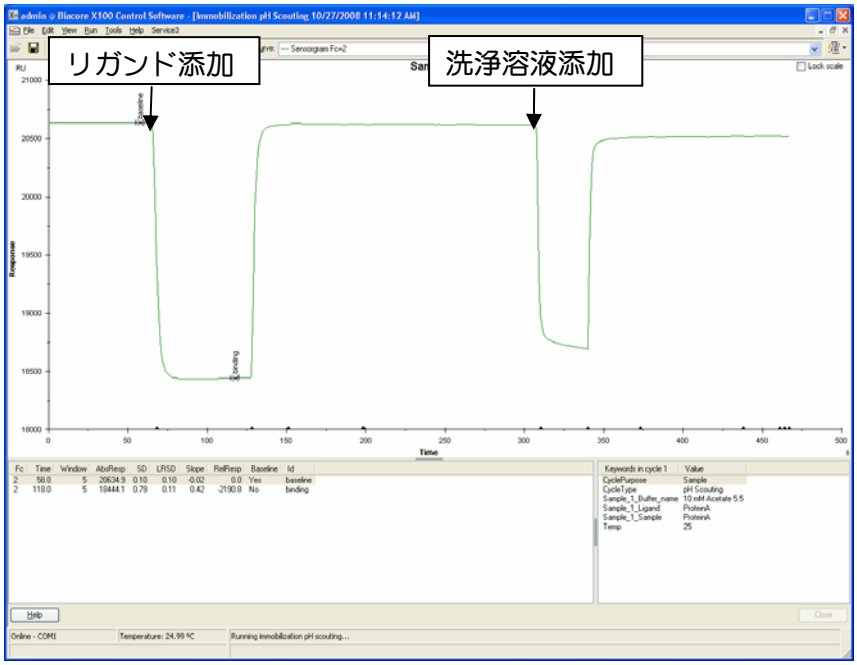
測定中サイクルの全コマンドを実行後、**Standby** 状態になる。

全コマンド実行終了を待たずに測定を中止したい場合には、キーボードの“Ctrl”キーと“Break”キーを同時に押す。

↓



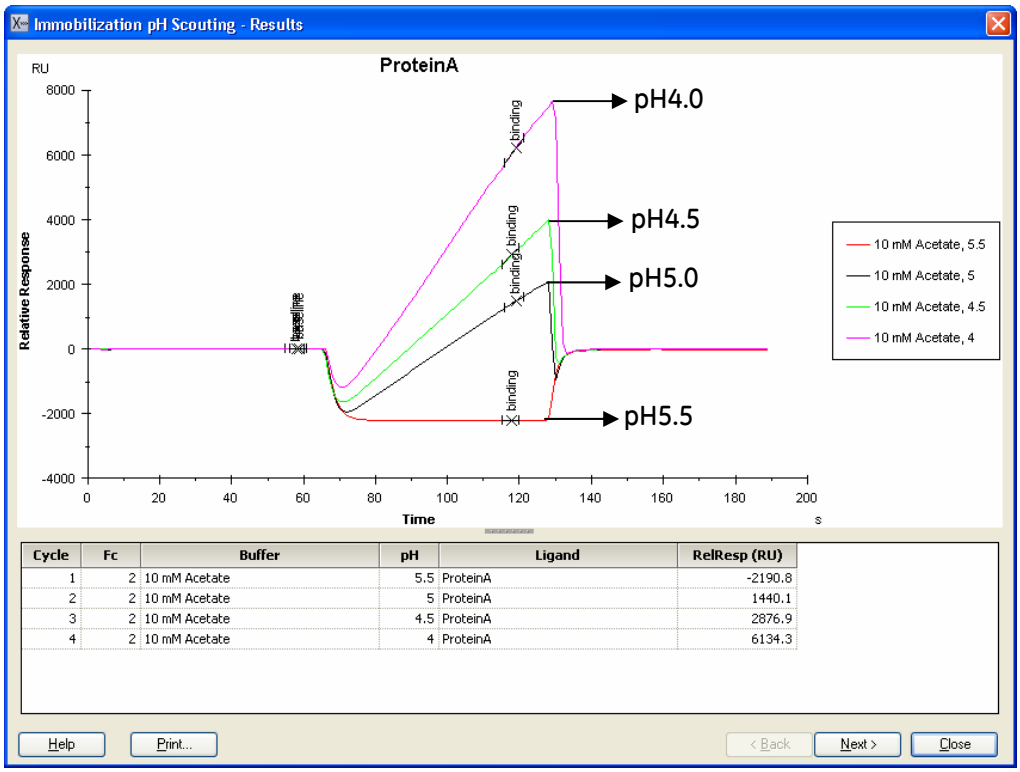
装置の洗浄を行う場合には、**Yes** をクリックする。洗浄後停止する。



上記サイクルを 1 サイクルとして、指定した緩衝液の測定を行う。

↓

測定が終了すると、**Results** ダイアログが現れる。



Cycle	Fc	Buffer	pH	Ligand	RelResp (RU)
1	2	10 mM Acetate	5.5	ProteinA	-2190.8
2	2	10 mM Acetate	5	ProteinA	1440.1
3	2	10 mM Acetate	4.5	ProteinA	2876.9
4	2	10 mM Acetate	4	ProteinA	6134.3

各緩衝液添加時のセンサーグラムが重ね書きで表示される。プレコンセントレーション効果が確認できる最も高い pH 条件で固定化を行う。(上記の場合、pH5.0 を採用する。)

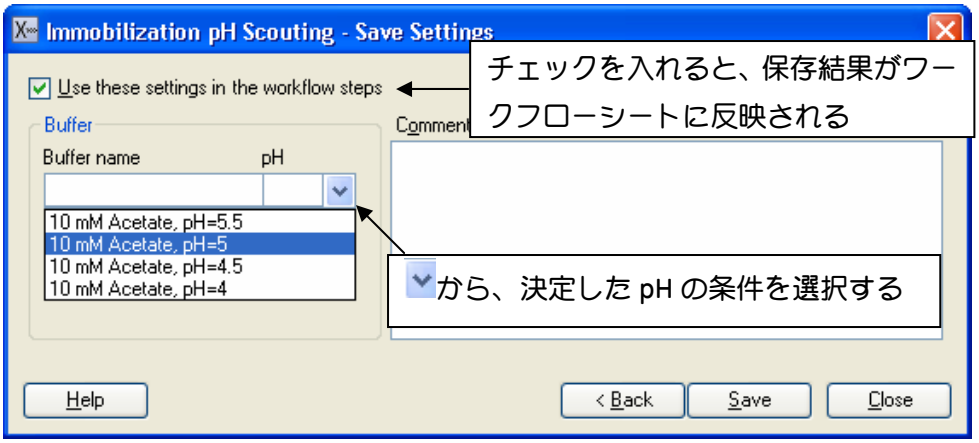
補足 5-3. リガンド希釈液の pH の選択方法

濃縮効果が確認できる最も高い pH を固定化条件として採用する。
上記結果では、pH4 が最も濃縮効果が高いが、pH が低いほど、活性型 NHS 基とアミノ基とのカップリング効率は低下する（活性化 NHS 基とアミノ基の至適反応条件は pH8.5）。
また、タンパク質の安定性は一般的に中性に近い程安定である。pH を変化させても、濃縮効果（添加時の傾き）に極端な差がない場合は、pH が高い条件を選択するのが望ましい。
上記結果では、pH5 を選択する。
なお、Immobilization pH Scouting における濃縮レベル以上の固定化は困難である。確認した濃縮レベル（RU）よりもっと多くの固定化量を望む場合は、リガンド濃度を上げて（例 100ug/ml 等）、再度 Immobilization pH Scouting を実施し濃縮レベルを確認する。
濃縮効果が確認できる最も高い pH を固定化条件として採用する。

Next>をクリックする。

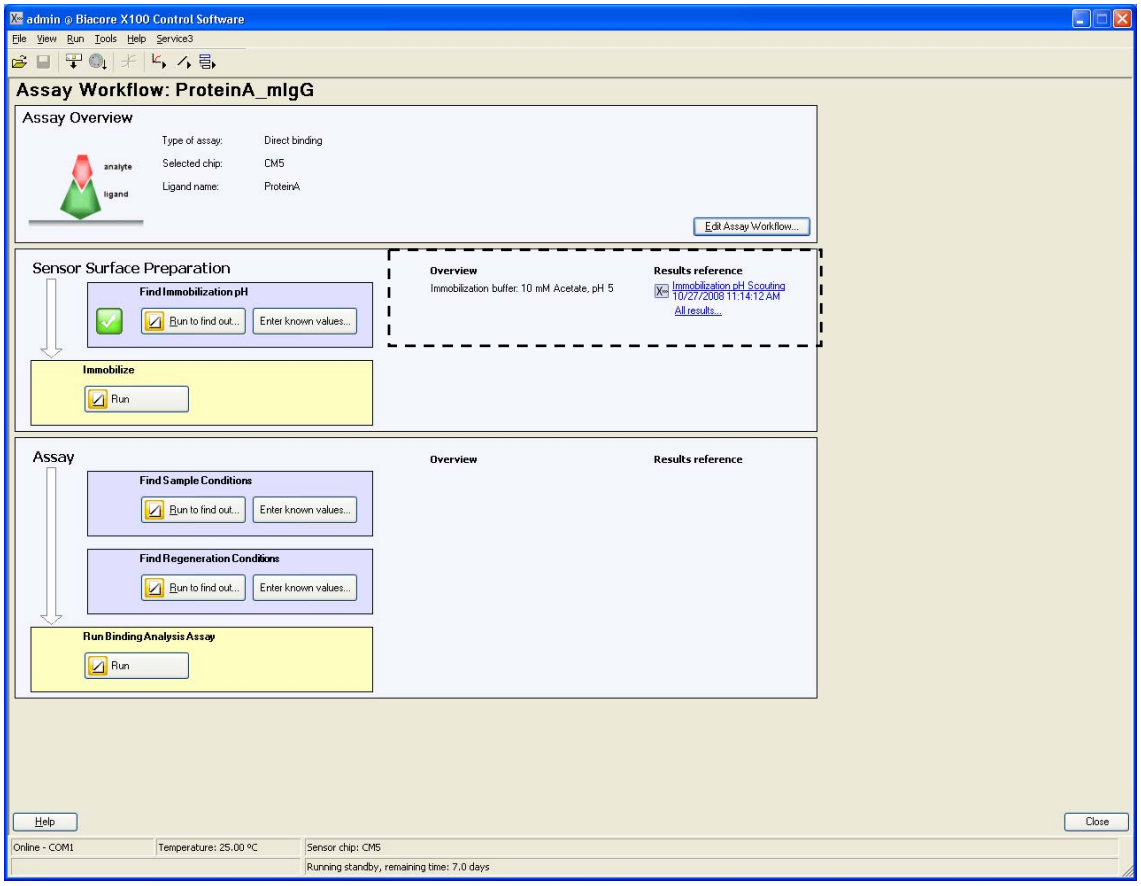
↓

Save Settings ダイアログが表示される。



Save をクリックする。

↓



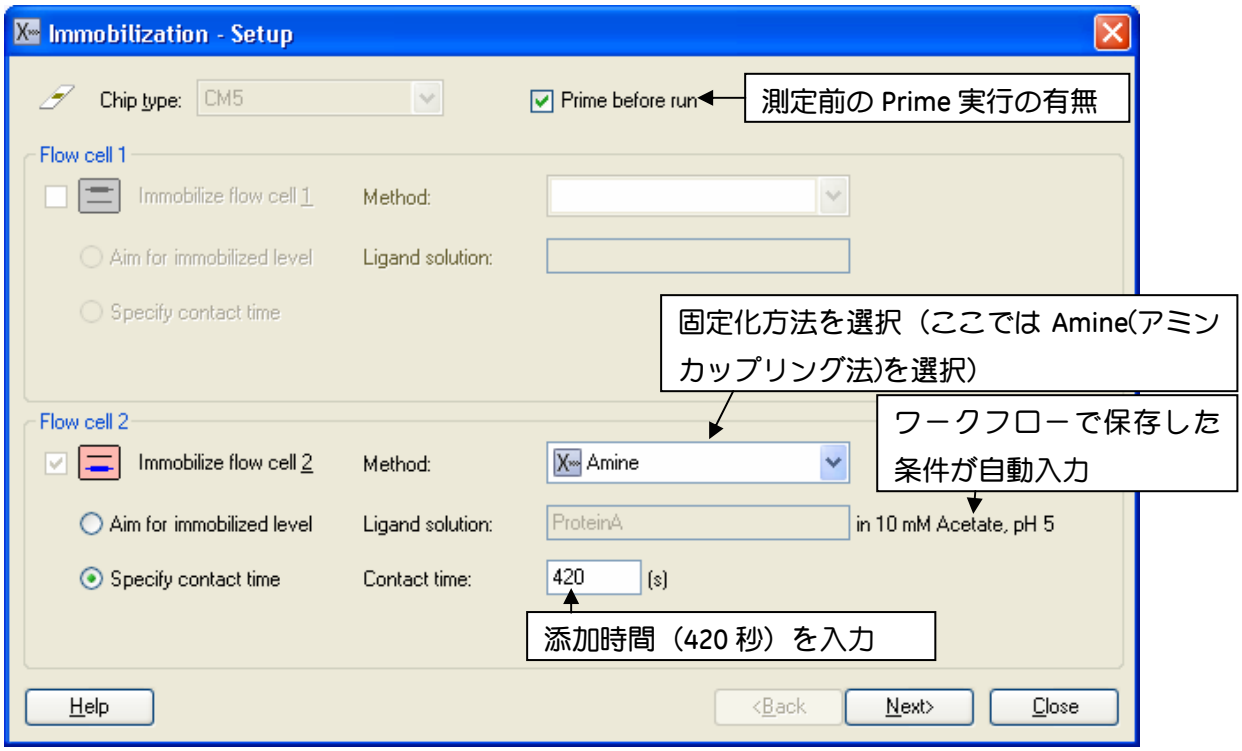
条件検討が終了すると、ワークフローシートの、**Find Immobilization pH** に（ ✅ ）が入る。**Overview** にリガンドの調製条件が表示され、**Results reference** で、**Find Immobilization pH** で実行した測定結果ファイルが表示される。ファイル名をクリックすると、測定結果ファイルを開くことができる。複数のファイルがある場合には、**All results...** をクリックし、ファイルの確認を行う。

5-3. 固定化の実行

固定化の詳細については、C（II ページ）を参照。

Immobilize の Run をクリックする。

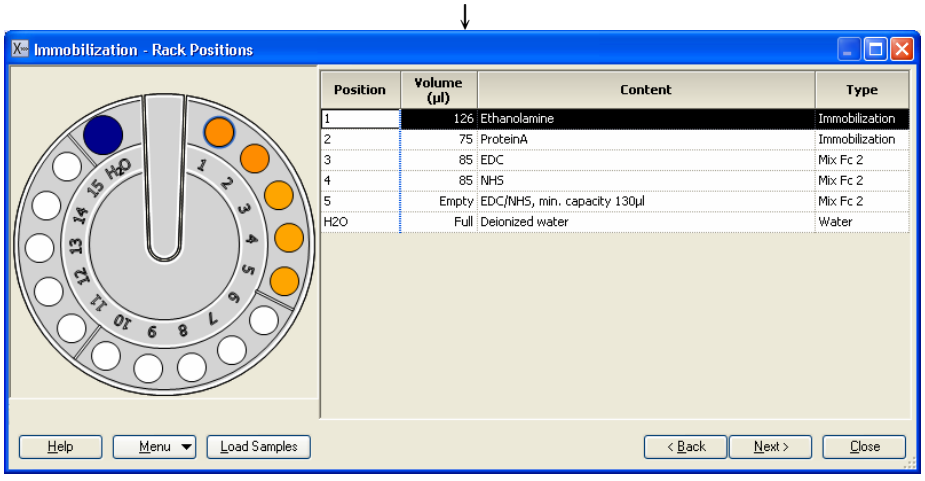
↓



ワークフローで実施する固定化は、フローセル 1 がリファレンスセル、フローセル 2 がリガンド固定化セルと設定されている。活性化およびブロッキング時間は 7 分間である。

Next>をクリックする。

↓



Rack Positions ダイアログが表示される。テーブルに従い必要サンプルをラックにセットする。

Ethanolamine	126 µl/ 11 mm プラスチックバイアル
Ligand	75 µl/ 11 mm プラスチックバイアル
EDC	85 µl/ 11 mm プラスチックバイアル
NHS	85 µl/ 11 mm プラスチックバイアル
空（NHS/EDC 混合用）	空/ 11 mm プラスチックバイアル

固定化時間・流速を変更した場合には必要量が変わる。

EDC と NHS を自動等量混合するための、空バイアルもセットする。

Next>をクリックする。

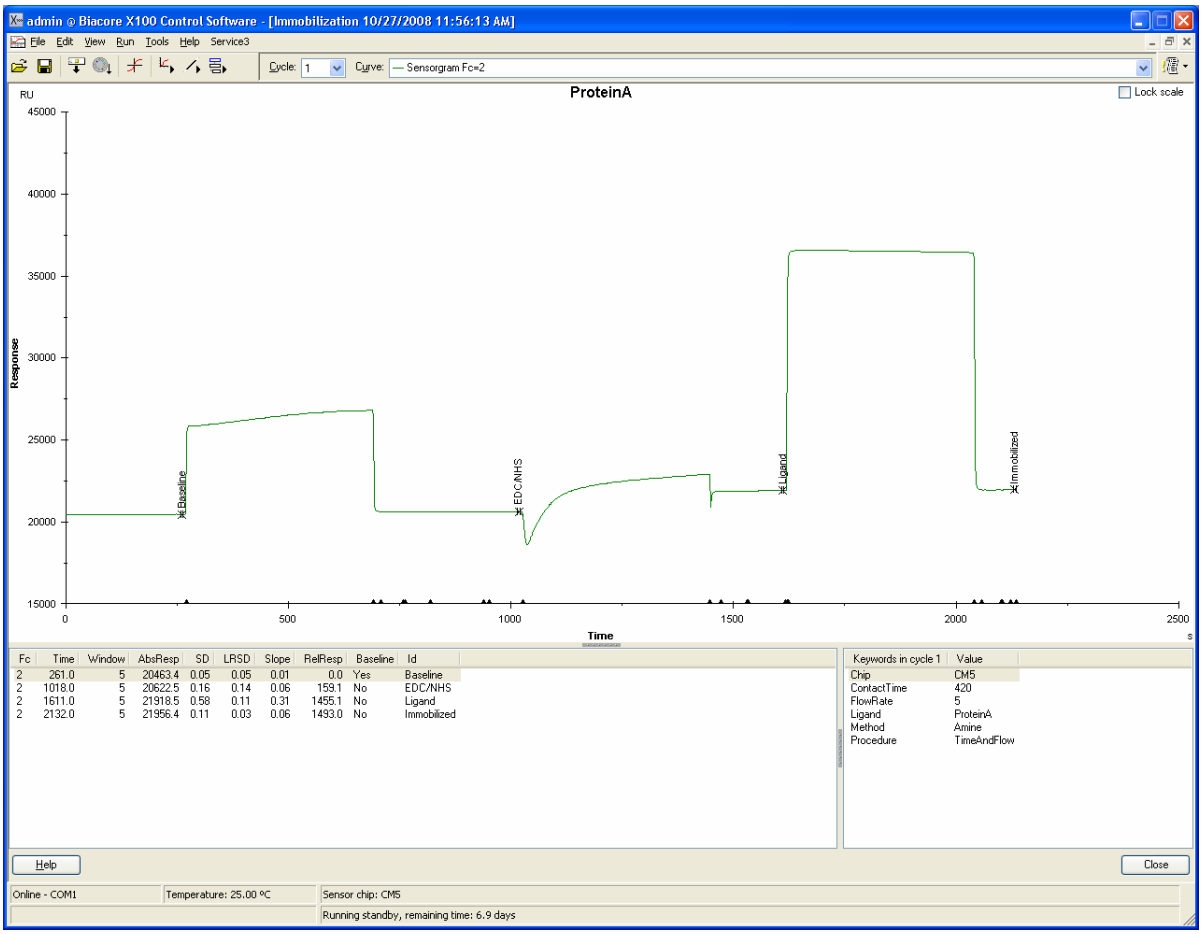
↓

確認画面が表示される。確認後、**Start** をクリックする。

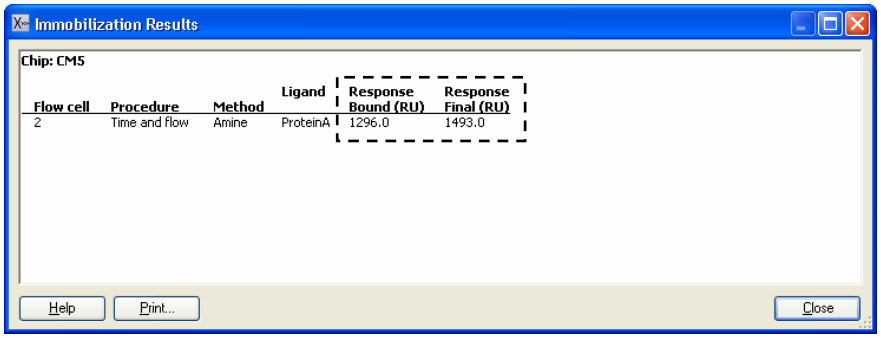
↓

結果の保存先とファイル名を指定後、**Save** をクリックする。測定を緊急停止したい場合は、Ctrl +キーと Break キーを同時に押す。補足 5-2.（104 ページ）を参照。

↓



固定化が終了すると装置は **Standby** 状態になる。測定データは入力したファイル名で自動保存される。**Immobilization Results** ダイアログが表示される。

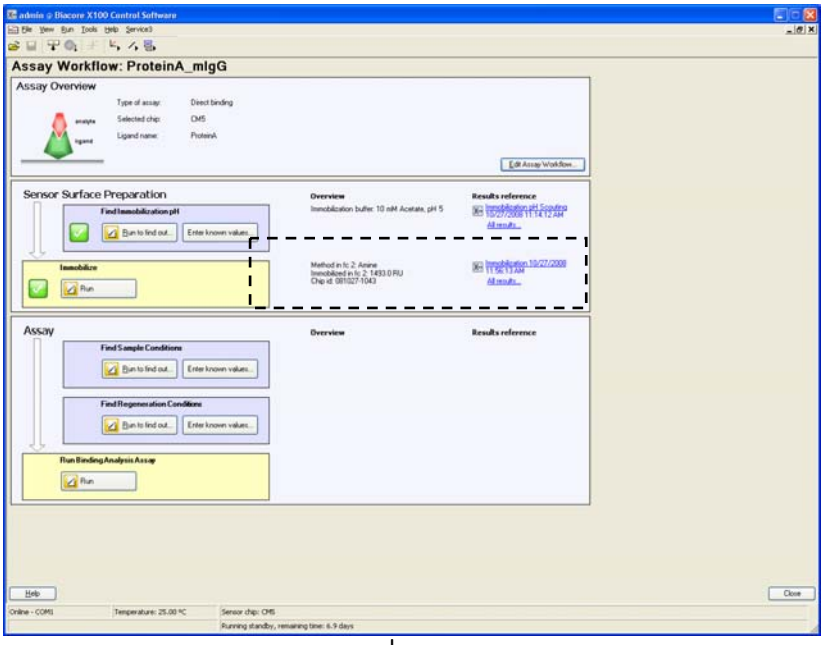


固定化量（**Response Bound** と **Response Final**）（**RU**）が表示される。

補足 5-4. 固定化量の評価

固定化量として **Response Bound** と **Final** の 2 種類が表示される。**Bound** は、リガンド添加前後のセンサーグラムの高さの差、**Final** は、NHS/EDC 添加前からエタノールアミン添加終了後の差である。リガンドがアグリゲーションしている場合やセンサーチップ表面に吸着する場合は、エタノールアミンを添加することにより、非共有結合でセンサーチップ表面に残ったリガンドは洗い流されるため、**Final** のレスポンスは **Bound** より小さくなる。また、極めて固定化量が少ない場合は、NHS 化した部分の大半に（一部はリガンドが導入されている）エタノールアミンが導入されるため、**Final** のレスポンスは **Bound** より大きくなることがある。いずれの場合も、レスポンスが小さい方を固定化量として採用する。

Immobilization Result ダイアログの **Close** をクリックする。センサーグラム右下の **Close** をクリックする。



↓

ワークフローシートの、**Immobilize** に（✅）が入る。**Overview** にリガンドの固定化方法、固定化量等が表示される。**Results reference** に、固定化の結果ファイルが表示される。

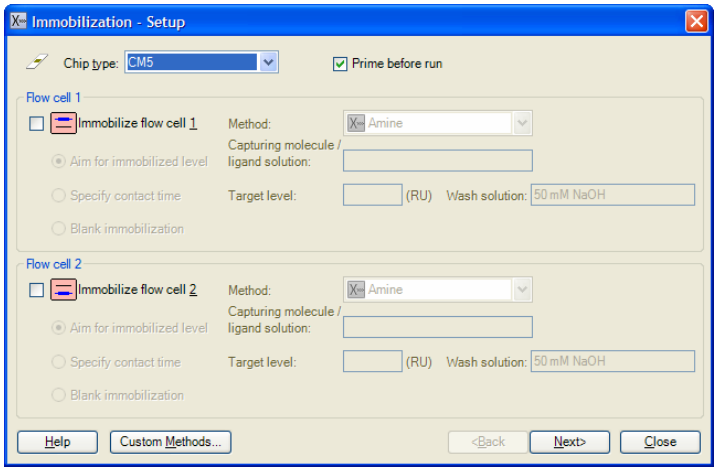
補足 5-5. 固定化テンプレートの変更

固定化の流速や活性化時間の変更を行う際や、フローセル 1 への固定化やブロッキングを行う時には、ワークフローを閉じ、**Wizards...** → **Immobilization** を実行する。

Other options の（)をクリックする。

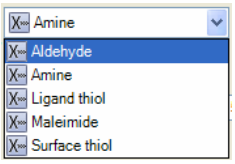
Wizards... → **Immobilization** をクリックする。**New** をクリックする。

↓



Chip type を選択し、固定化を行うフローセルを選択する。

Method:のプルダウンメニューをクリックして選択する。



リガンド添加方法を選択する。

〇Aim for immobilized level　Target level にターゲット固定化量を入力する。自動で固定化量を調整する。

Wash solution:　固定化前に実施する濃縮効果確認後の、チップ表面の洗浄溶液を指定する。通常は、50 mM NaOH を指定する。（固定化前の洗浄なので、リガンドへの影響はない。）

〇Specify contact time　入力した時間リガンドを添加。

〇Blank immobilization　活性化・ブロッキングのみ行う。

↓

Next>をクリックする。

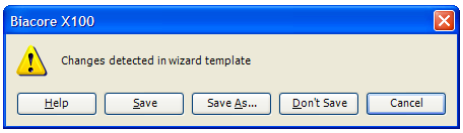
↓

Rack Position ダイアログが表示される。テーブルに従いサンプルをラックにセットする。**Next>**をクリックする。

↓

確認後、**Start** をクリックする。

↓



作成したテンプレートを保存するかどうか、メッセージが表示される。必要があれば、**Save As...**で名前を付けて保存を行う。保存しない場合は、**Don't Save** をクリックする。

↓

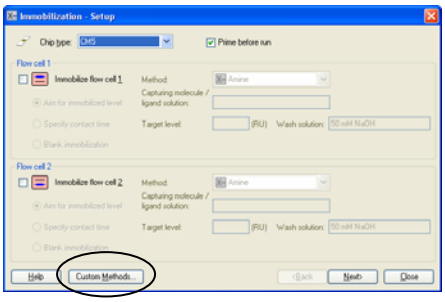
結果の保存先とファイル名を指定後、**Save** をクリックする。測定を緊急停止したい場合は、補足 5-2.（104 ページ）を参照。

↓

測定が終了すると、装置は **Standby** 状態になる。

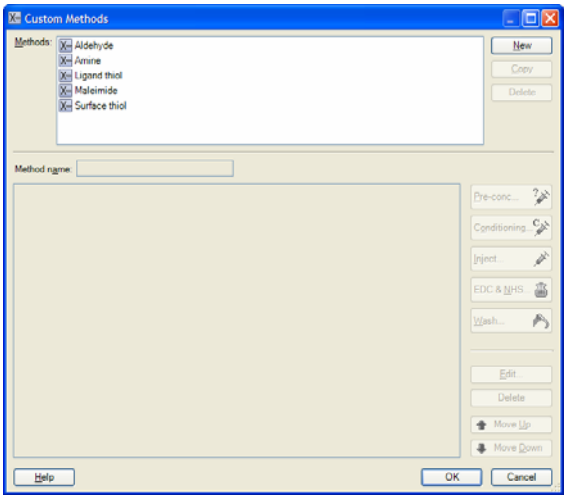
メソッドの変更とコマンドの追加

① メソッドの変更



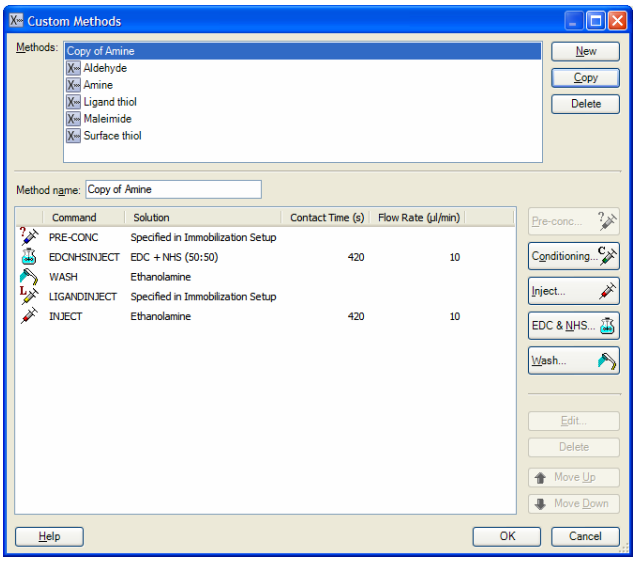
Setup ダイアログの **Custom Methods...**をクリックする。

↓



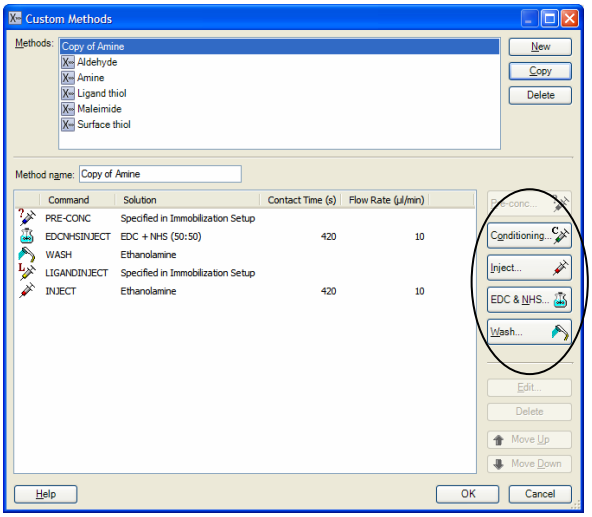
Methods:の各種固定化方法をクリックすると、テンプレートの固定化詳細が確認できる。
テンプレートの固定化条件を変更する際は、固定化方法を選択した状態で、**Copy** をクリックする。

↓



Method に追加される。**Method name** で名前の変更が可能。
コマンドをダブルクリックまたは選択後 **Edit...**をクリックすると、各種設定の変更が可能。

② コマンドの追加



ダイアログ右下のアイコンを選択して、コマンドを指定する。
OK をクリックする。

↓

変更および追加したメソッドは、**Set up** ダイアログの **Method：**で選択可能となる。

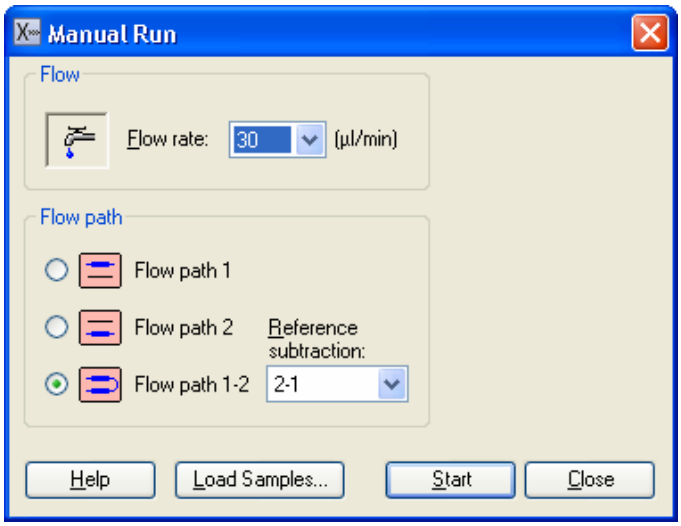
5-4. 特異的結合の確認および再生条件の検討

特異的結合の確認および再生条件の検討は、マニュアル測定でも、ワークフローからウィザードを使用した測定でも、両方対応できる。どちらかの測定方法を選択して条件検討を行う。

5-4-1. マニュアル測定による検討

マニュアル測定で条件検討する場合は、ワークフローは一旦閉じる。
Other options の（ ）をクリックし、 **Manual Run...**をクリックする。

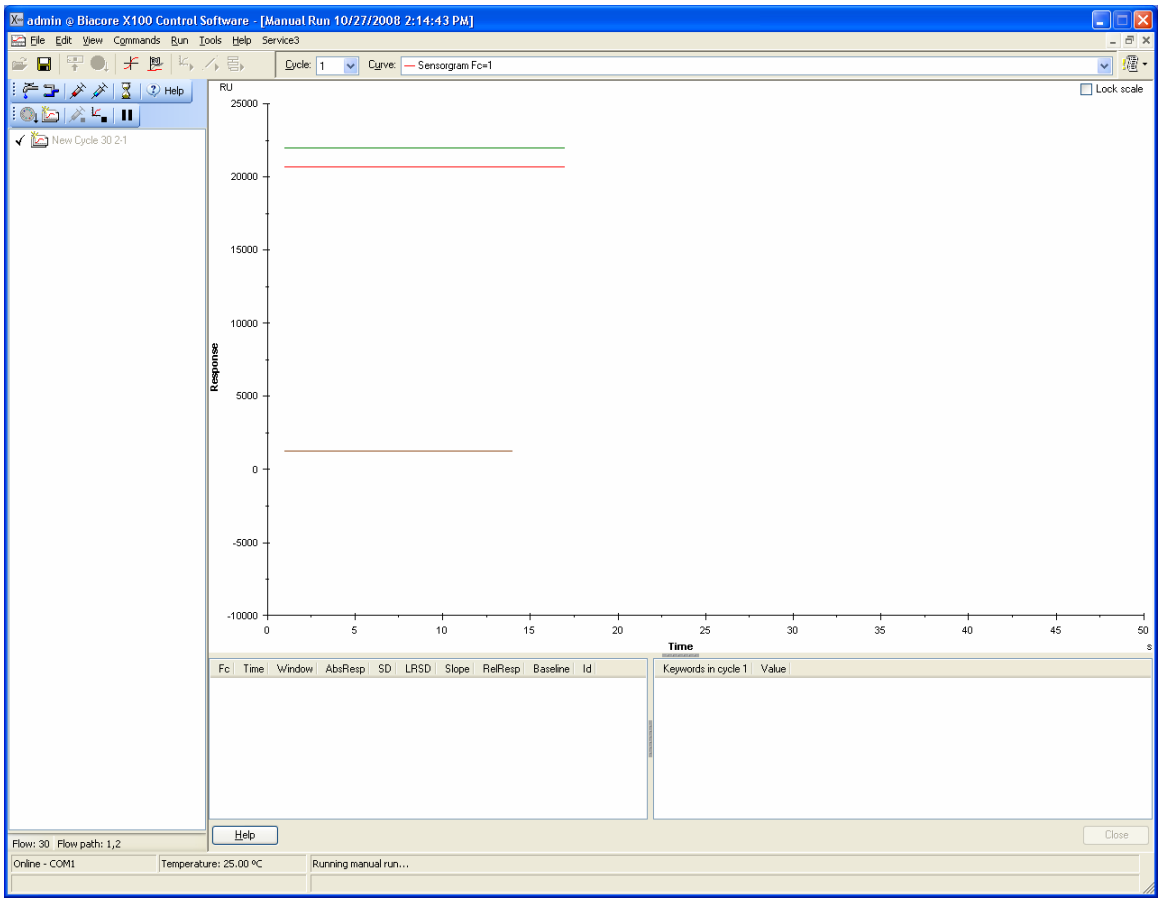
↓



流速は 30 µl/min、Flow path は 1-2、Reference subtraction は 2-1 を設定する。
Start をクリックする。

↓

ファイル名を入力し、**Save** をクリックする。



フローセル 1 は赤、フローセル 2 は緑、2-1 の差し引きは茶色のセンサーグラムで表示される。

補足 5-6. センサーグラムの表示の変更

・1 本表示

View → Show Only Current Curve

右上のカーブリストから、表示するセンサーグラムを選択する。

・複数表示

View → Show All Curves

すべてのセンサーグラムを表示することができる。

・種別表示

View → Show Curves of Same Type

カーブリストから各フローセルのセンサーグラムもしくは差し引きセンサーグラムを選択できる。

補足 5-7. コマンドの説明

；流速の選択（流速 5、10、30 µl/min から選択）

；流路の切り替え（Detection1,2 に設定している場合利用可能）

；サンプル添加

；再生溶液添加

；待機（次の操作コマンドを実行するまでの時間を任意で設定できる）

；ヘルプボタン（Support Navigator を表示）

；サンプルラックの取り出し

；サイクルの切り替え。センサーグラムを新たにスタートする。

；添加の中止（サンプルおよび再生溶液添加時に実行可能）

；測定の終了（全てのコマンドを実行後に、自動で Standby 状態に入る）

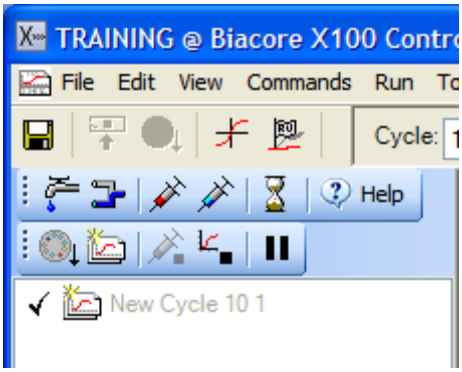
；一時停止（予約コマンドの一時停止が可能）

；再スタート（一時停止の解除）

コマンドは、コマンドテーブルに任意で追加が可能。追加されたコマンドは、上から順番に実行される。実行中のコマンドは、（ ）が付く。実行が終了したコマンドは、（ ✓ ）が付く。

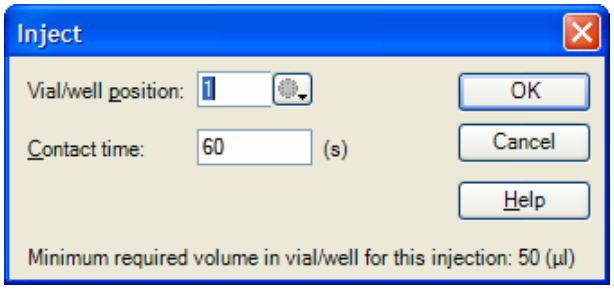
アナライトの添加

画面左上のアイコンを選択して、測定コマンドを指定する。(各コマンドの説明は補足 2-1. 参照。または、 Help をクリックしサポートナビゲーターを参照する。)



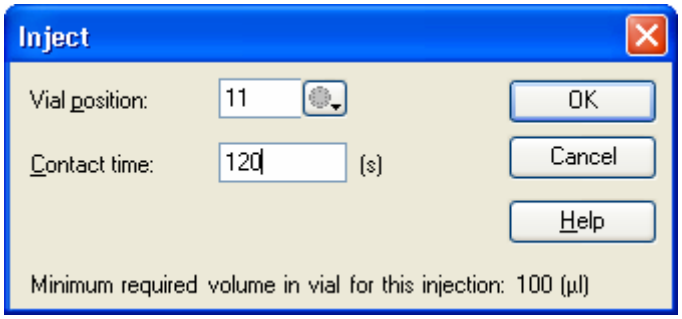
アナライトを添加する際は、**Injection command**（ ）をクリックする。

↓



Vial/well position:の（ ）をクリックし、サンプルをセットする位置にマウスを移動しクリックする。

↓



Contact time:にアナライト添加時間（通常 60 秒～120 秒）を入力すると、必要量がダイアログ下部に表示される。バイアル内に必要量があることを確認する。相互作用測定の条件検討の詳細は、D-2.（VII ページ）を参照。

OK をクリックする。

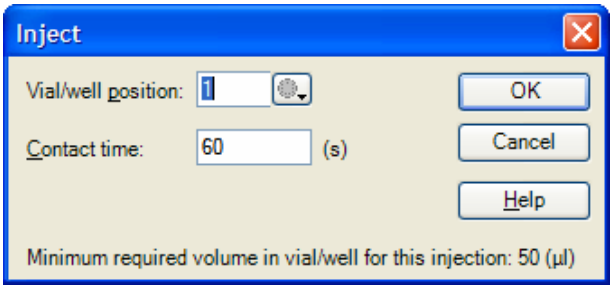
（この時点でサンプルをラックにセットする場合は、一旦、**Cancel** をクリックし、**Inject** ダイアログを解除する。）

↓

Load Samples アイコン（ ）を選択する。

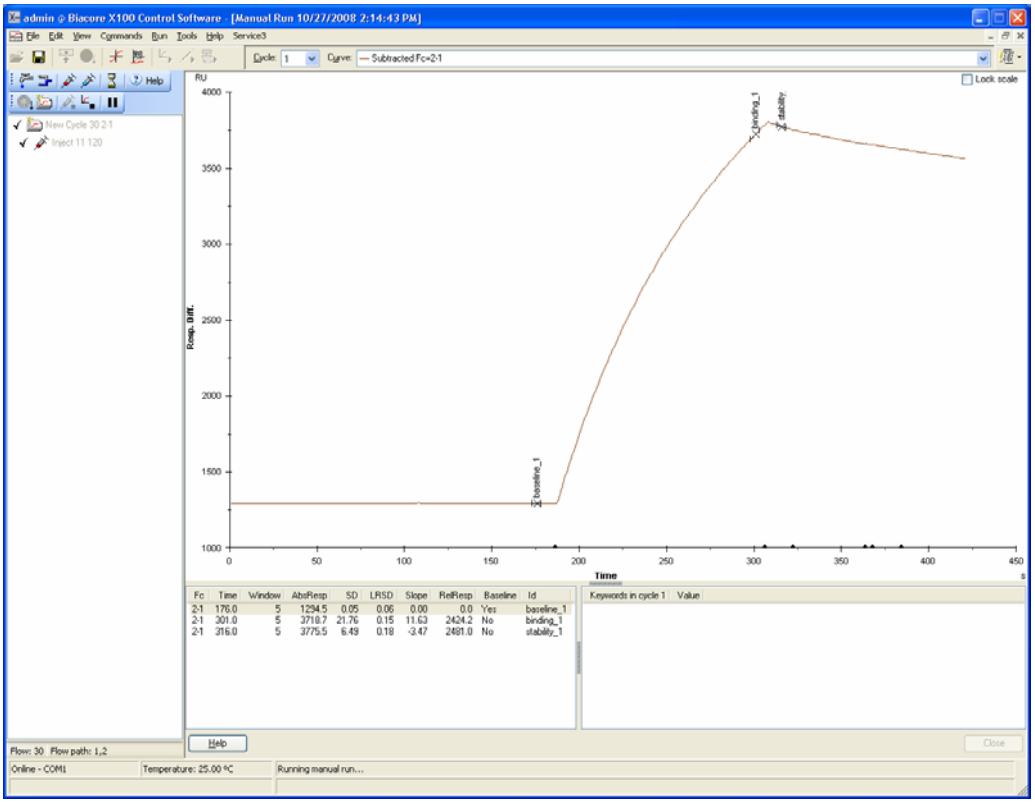
ラックを取り出し、適切な量のサンプルを分注したバイアルをセットする。
ラックを再び装置にセットし、OK を選択する。再び、**Injection command**（ ）をクリックする。

↓



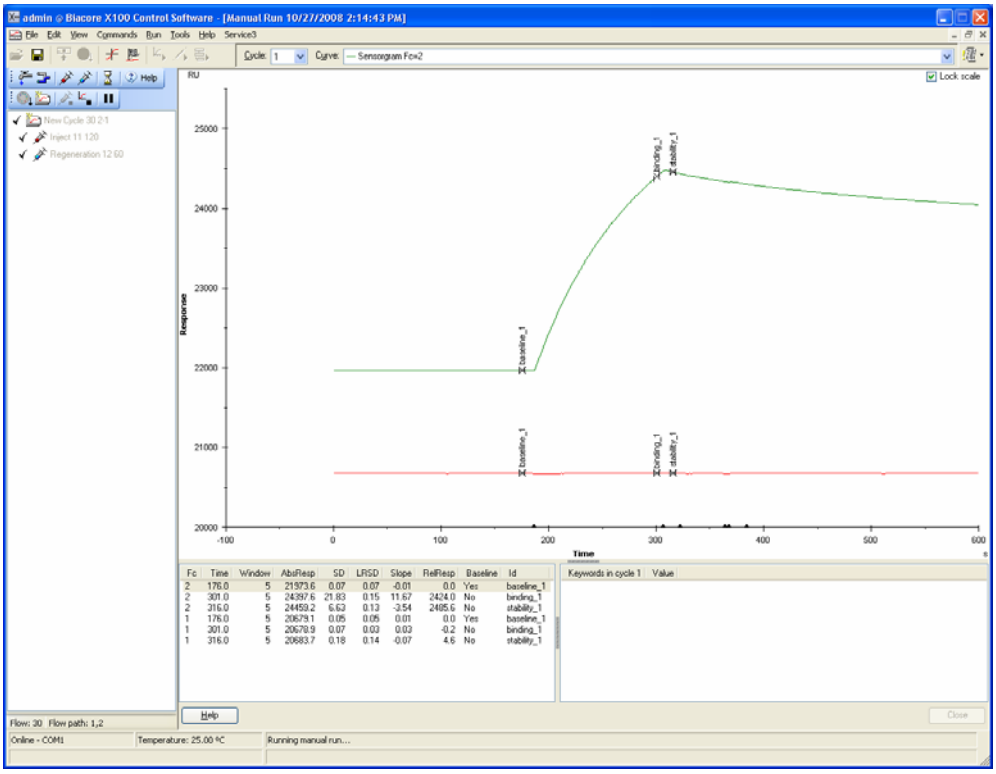
サンプル位置および添加時間（秒）を入力する。

↓



2-1 の差し引きのセンサーグラムを表示し、特異的結合が見られるかどうか確認する。

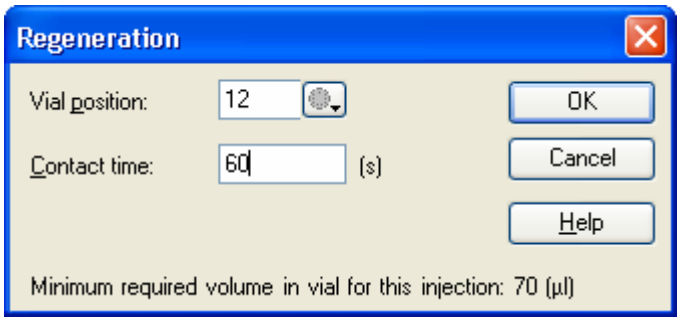
↓



リファレンスセルへの非特異的吸着がないかどうか、確認する。

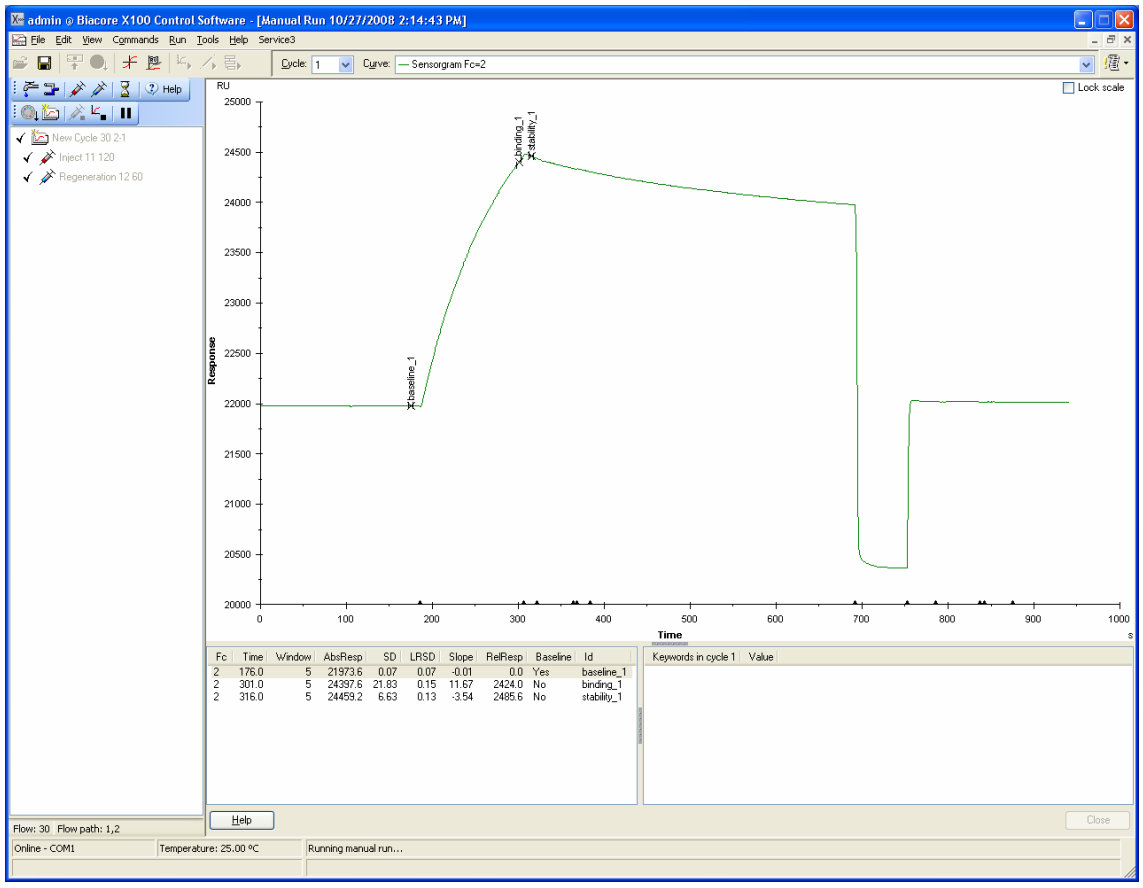
再生条件の検討

再生溶液を添加する際は、**Regeneration Command...**（ ）をクリックする。



再生溶液の種類、添加時間については、D-1. 相互作用の条件検討を参照する。

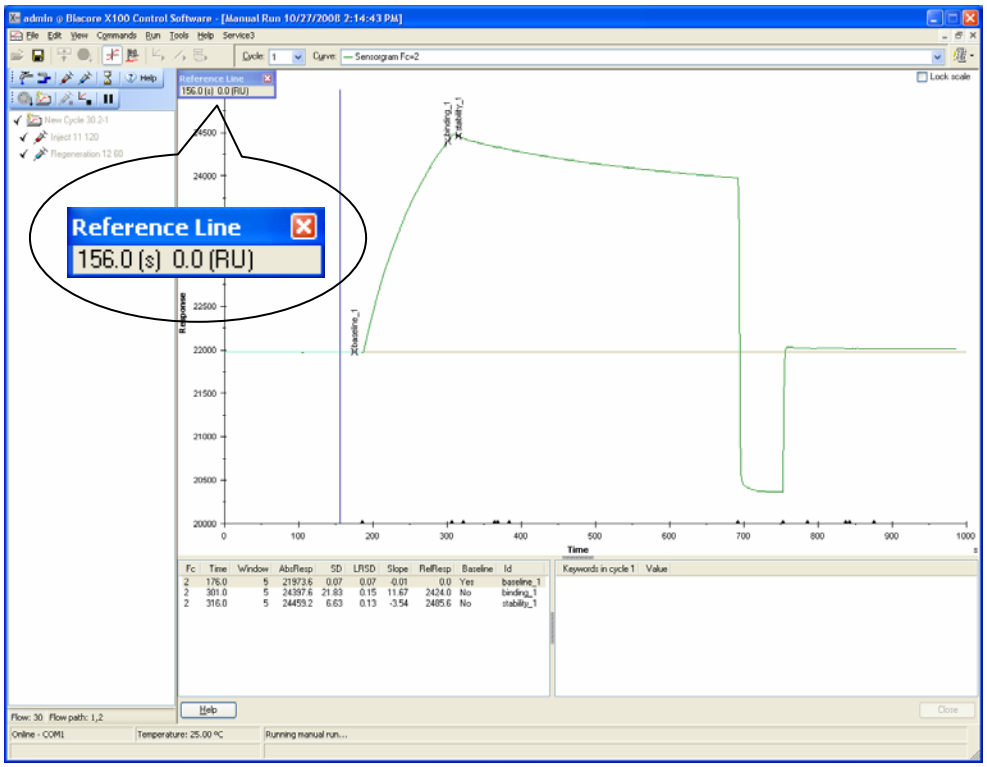
↓



（再生溶液添加後の結合量の確認）

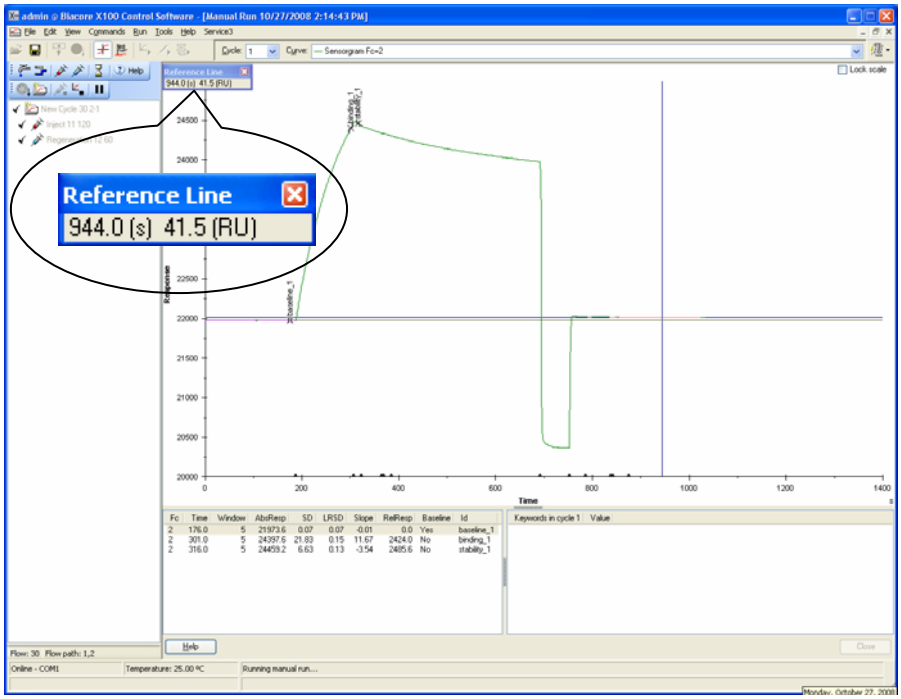
View → **Reference Line**（ ）をクリックする。

↓



リファレンスラインの縦軸を、左ボタンのドラッグでアナライト添加前に移動させ、**View → Baseline** をクリックする。リファレンスラインウィンドウが 0 になる。

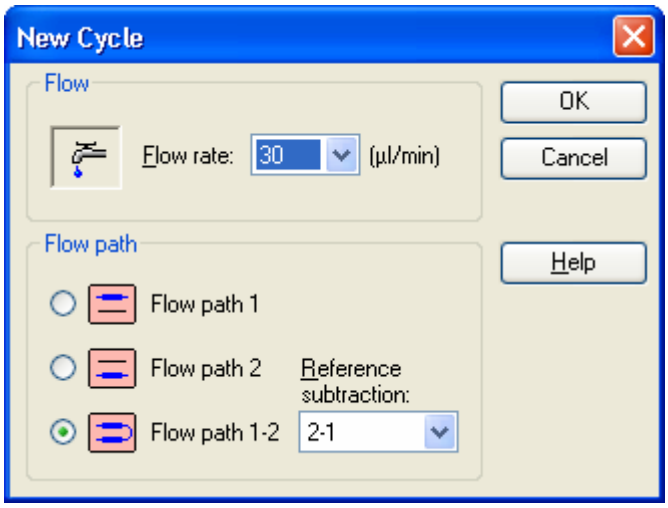
↓



再生溶液添加後に、リファレンスラインの縦軸を左ボタンのドラッグで移動し、再生後のアナライト結合量を確認する。

新規サイクルへの変更

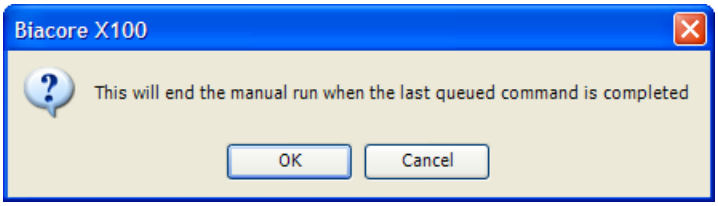
New Cycle...アイコン（ ）もしくは、メニューバーの **Commands** → **New Cycle...**をクリックする。



流速、Flow path の設定を確認後、**OK** をクリックする。
測定サイクルが切り替わる。

測定の終了

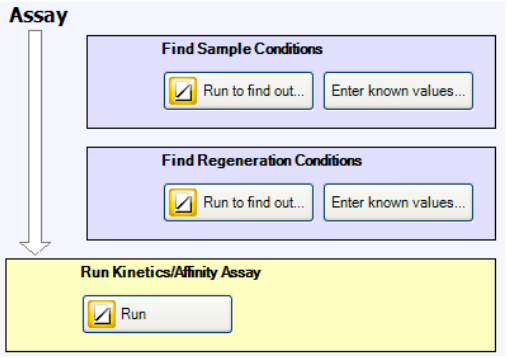
End manual run アイコン（ ）またはメニューバーの **Run** → **Stop Run...**をクリックする。



OK をクリックする。指定したコマンドを全て実行した後に、自動的に **Standby** 状態になる。

5-4-2. ウィザード測定による検討

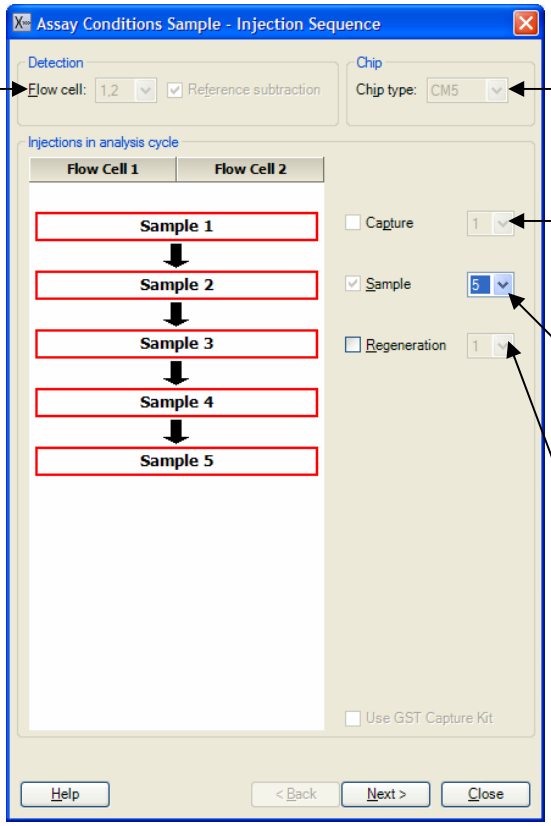
アナライトの条件検討



ワークフローシートの **Find Sample Conditions** → **Run to find out...**をクリックする。（既に条件が決まっている場合には、**Enter known values...**をクリックして、条件を入力する。）

↓

フローセル 1,2 に自動設定されている。また、**Reference subtraction** が自動選択され、リファレンスセル（フローセル 1）と固定化セル（フローセル 2）の差し引きセンサーグラムがリアルタイムに表示される。



ワークフローで指定したセンサーチップが自動選択される。

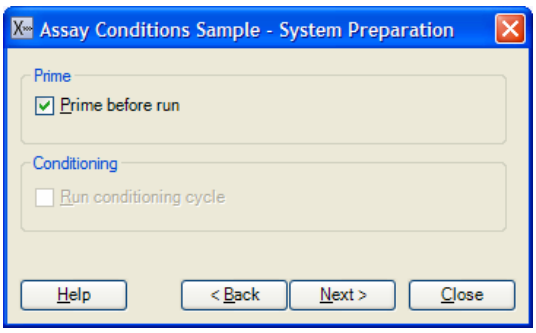
キャプチャー法でリガンドを固定化する場合は、チェックを入れる。

最大 5 アナライトの添加が可能。

チェックを入れると、相互作用検討後に再生溶液を添加することができる。初めて相互作用の検討を行う際は、次の **Find Regeneration Step** で検討を行うことを勧める。

Next>をクリックする。

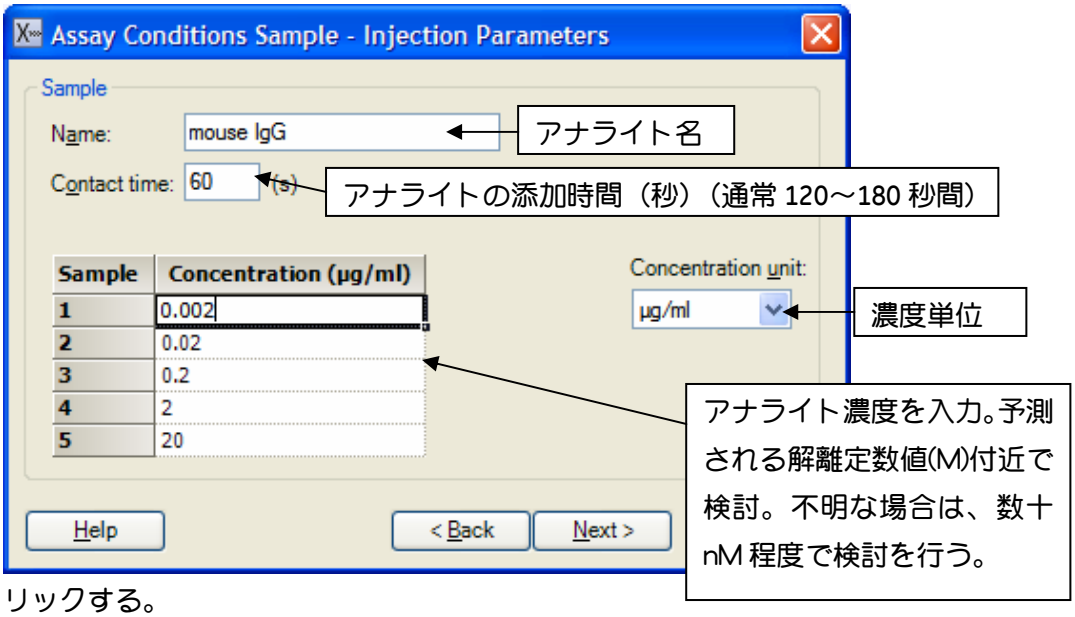
↓



Prime before run　　測定前に **Prime** を実行する場合は、チェックする。

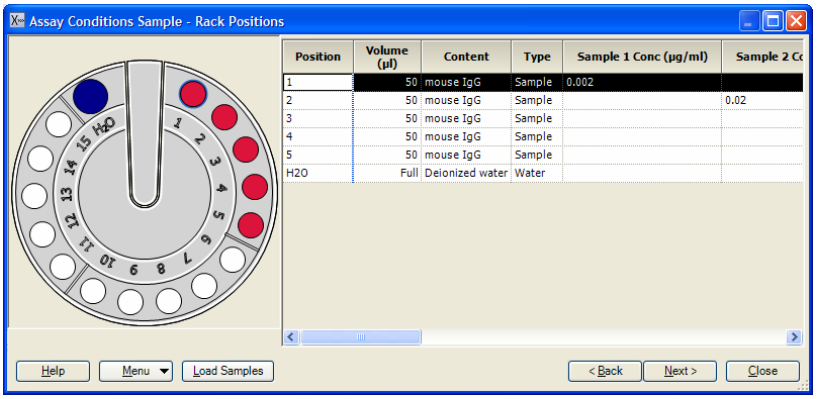
Next>をクリックする。

↓



Next>をクリックする。

↓



Rack Positions ダイアログが表示される。テーブルに従いアナライトをラックにセットする。**Next>**をクリックする。

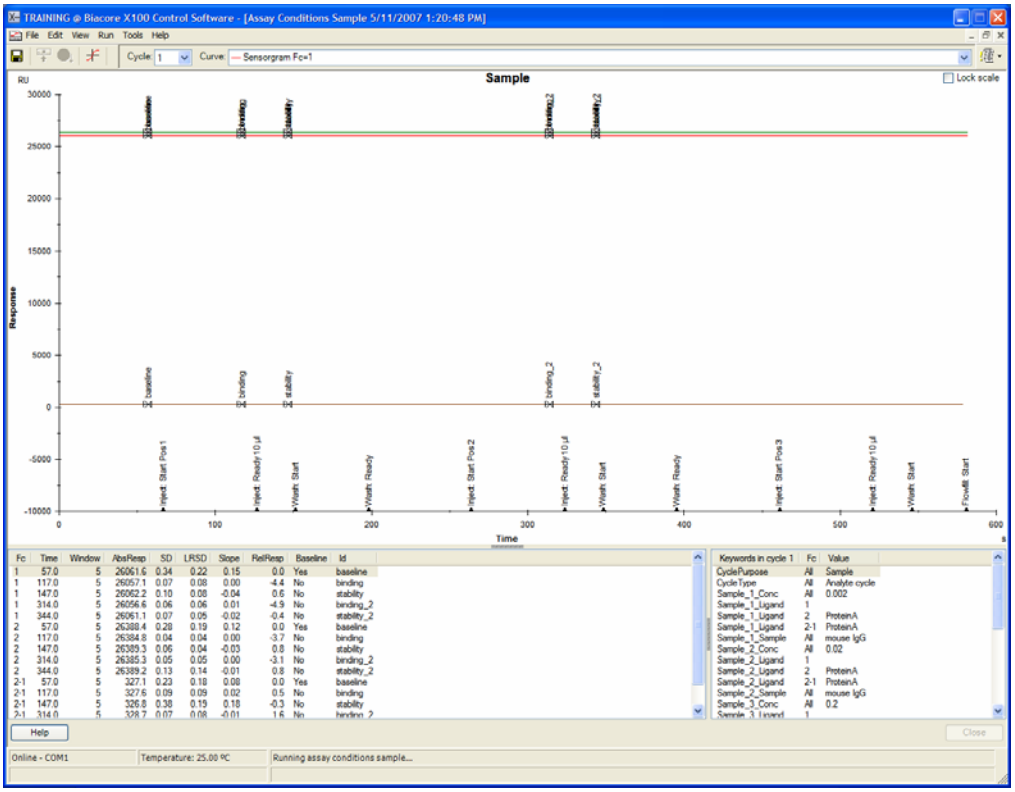
↓

確認画面が表示される。確認後、**Start** をクリックする。

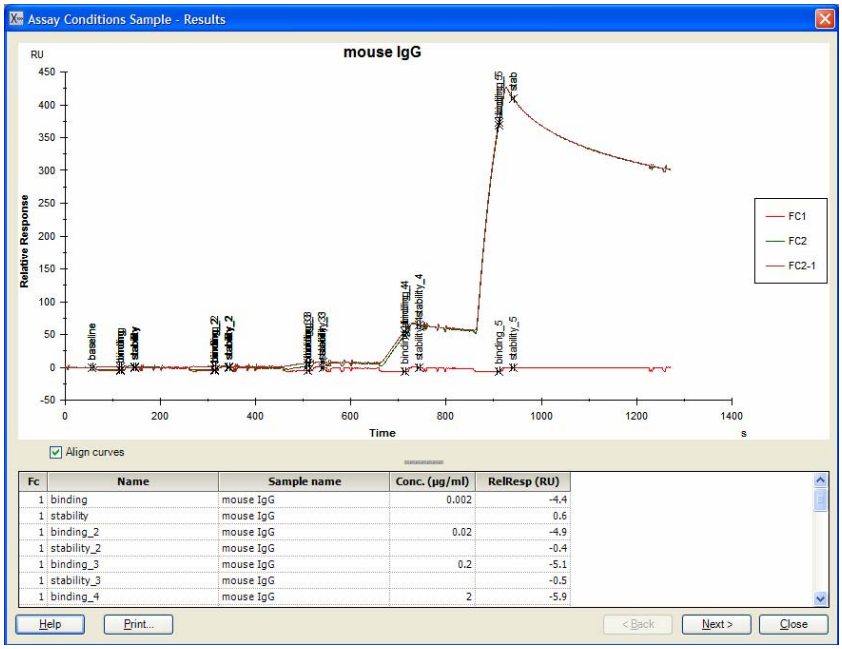
↓

結果の保存先とファイル名を指定後、**Save** をクリックする。測定を緊急停止したい場合は、Ctrl キーと Break キーを同時に押す。補足 5-2.（104 ページ）を参照。

↓



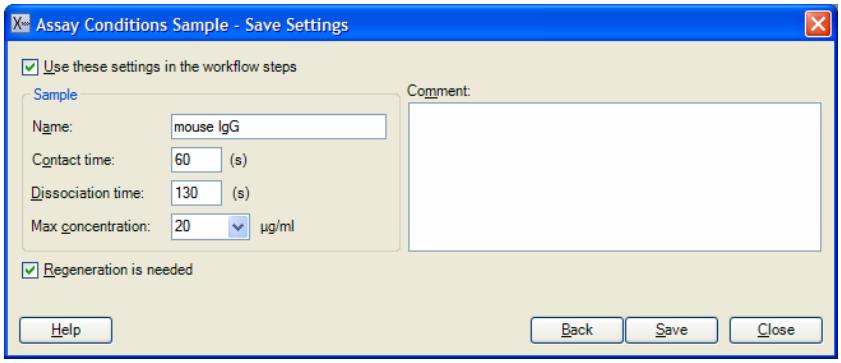
↓



Fc	Name	Sample name	Conc. (µg/ml)	RelResp (RU)
1	binding	mouse IgG	0.002	-4.4
1	stability	mouse IgG		0.6
1	binding_2	mouse IgG	0.02	-4.9
1	stability_2	mouse IgG		-0.4
1	binding_3	mouse IgG	0.2	-5.1
1	stability_3	mouse IgG		-0.5
1	binding_4	mouse IgG	2	-5.9

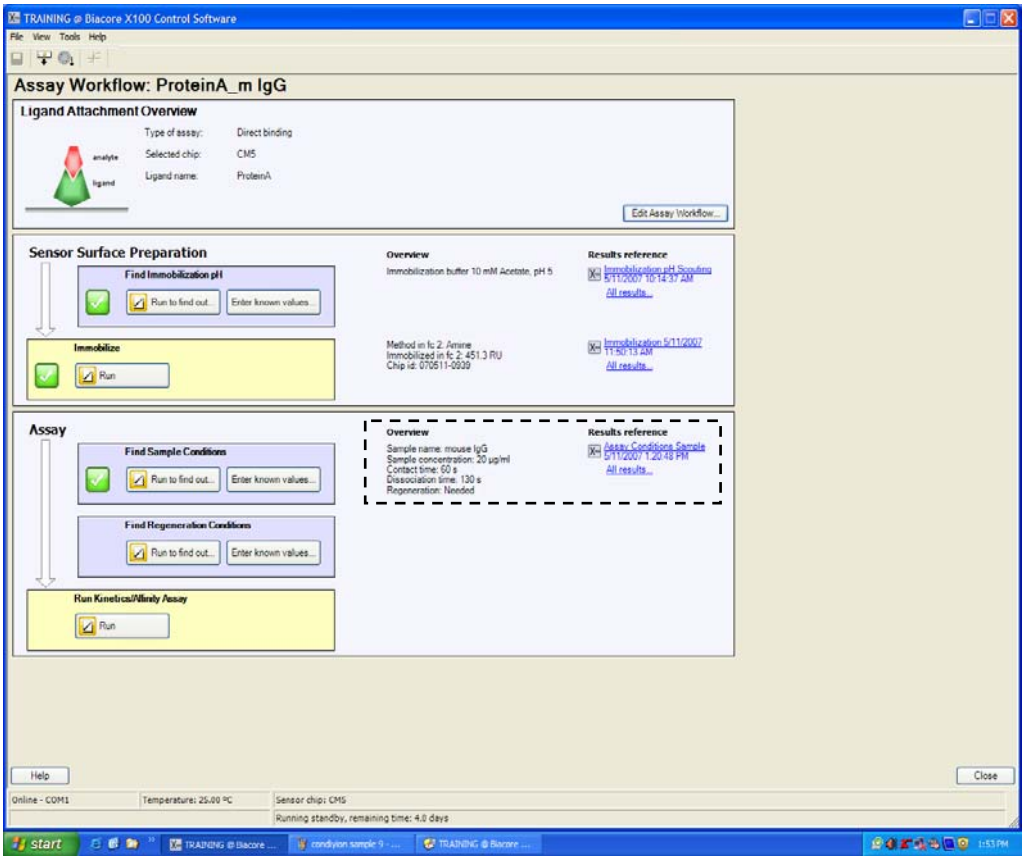
測定が終了後、**Results** ダイアログが表示される。装置は **Standby** 状態になる。
レポートポイントテーブルで結合量の確認を行う。
Next>をクリックする。

↓



Save Settings ダイアログが表示される。
測定結果を考慮し、添加時間、解離時間、最大濃度、再生の必要性を決定する。
Save をクリックする。

↓

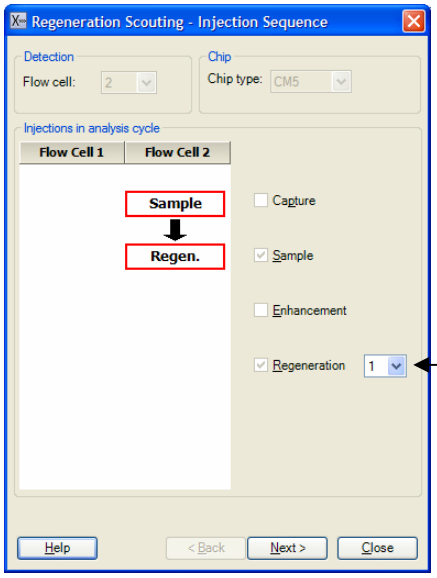


ワークフローシートの、**Assay→Find Sample Conditions** の **Run to find out…**に（ ✅ ）が入る。**Overview** にアナライト添加時間と解離時間、最大濃度等が表示される。

再生条件の検討

Find Regeneration Conditions → **Run to find out...**をクリックする。(既に条件が決まっている場合には、**Enter known values...**をクリックして、条件を入力する。)

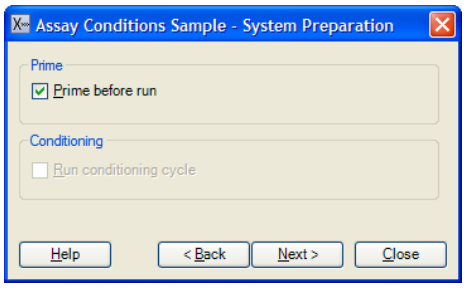
↓



最大 2 回の再生溶液の添加が可能

Next>をクリックする。

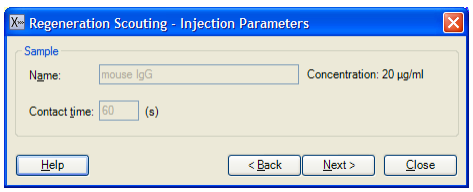
↓



Prime before run　　測定前に Prime を実行する場合は、チェックを入れる。

Next>をクリックする。

↓



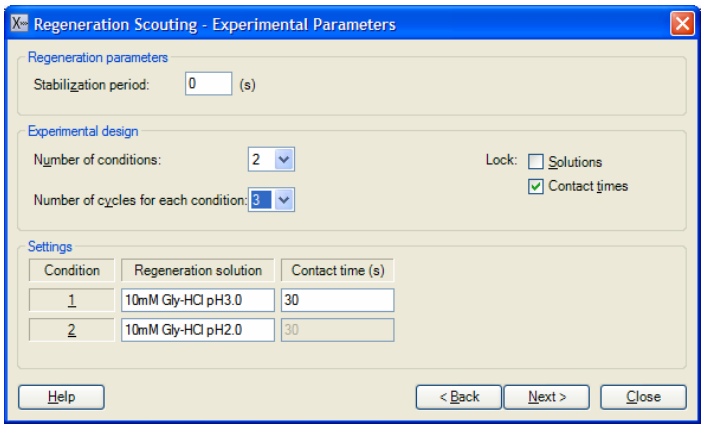
Injection Parameters ダイアログが表示される。

Sample の各項目は、**Find Sample Conditions** で保存した条件が自動入力される。

(変更を行う場合は、**Find Sample Conditions** の **Enter known values...**をクリックして、条件を入力する。)

Next>をクリックする。

↓



Experimental Parameters ダイアログが表示される。

Regeneration parameters・・・

Stabilization period:　アナライト添加前のベースラインの安定化時間（秒）

Experimental design・・・

Lock:　**Solutions** のみにチェックを入れると、1 種類の再生溶液について、添加時間を変更した検討が可能。
Contact time のみにチェックを入れると、複数種類の再生溶液について、一定の添加時間で検討が可能。
Solutions および **Contact time** のチェックを外すと、再生溶液の種類および添加時間を個別に検討可能。

Number of conditions:　再生溶液の種類の数を選択する。最大 7 種類まで選択可能。詳細については、VIII ページを参照。

Number of cycles for each conditions:
各再生溶液を用いた相互作用測定の繰り返しサイクル数。最大 5 サイクルまで選択可能。

Settings・・・

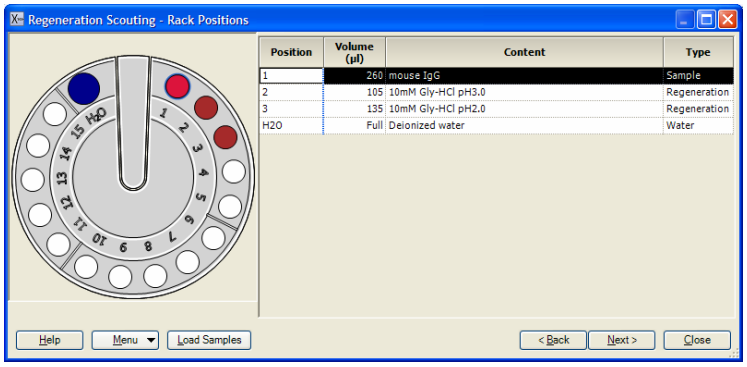
Regeneration solution　再生溶液名

Contact time(s)　再生溶液添加時間（秒）

再生溶液を 2 回添加する場合には、Regeneration solution1 および 2、Contact times 1 および 2 のカラムが表示される。

Next>をクリックする。

↓



Rack Positions ダイアログが表示される。テーブルに従いサンプルをラックにセットする。**Next>**をクリックする。

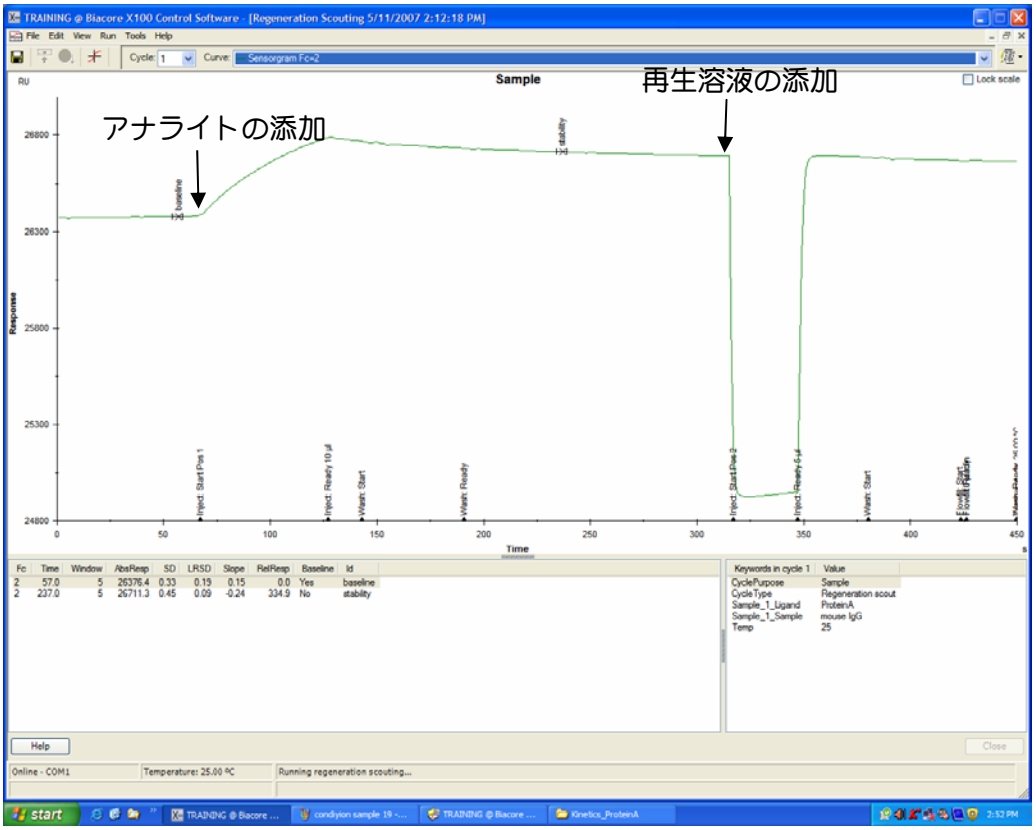
↓

確認画面が表示される。確認後、**Start** をクリックする。

↓

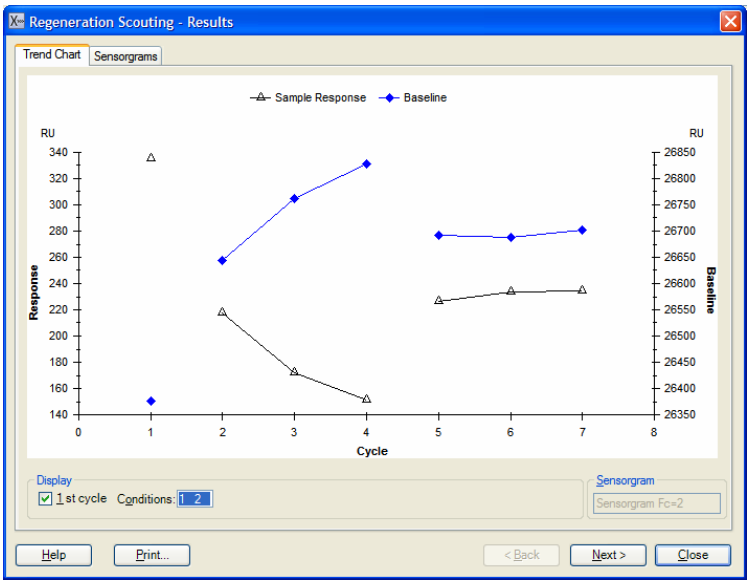
結果の保存先とファイル名を指定後、**Save** をクリックする。測定を緊急停止したい場合は、Ctrl キーと Break キーを同時に押す。補足 5-2.（104 ページ）を参照。

↓



アナライト添加と再生溶液添加を 1 サイクルとして、指定したサイクル数実行する。

↓



測定が終了後、**Result** ダイアログが表示される。装置は **Standby** 状態になる。

●Trend Chart タブ

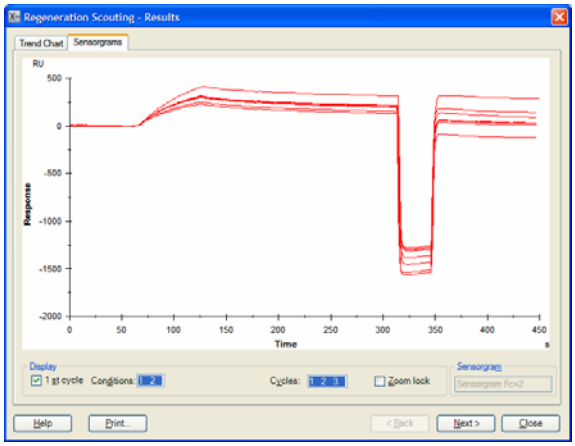
Response　アナライトの結合量のプロット

Baseline　再生後のベースラインのプロット

Display・・・　1st cycle のチェックを外すと、1 サイクル目のデータが消える。

Conditions:　結果の抽出が行える。

●Sensorgrams タブ

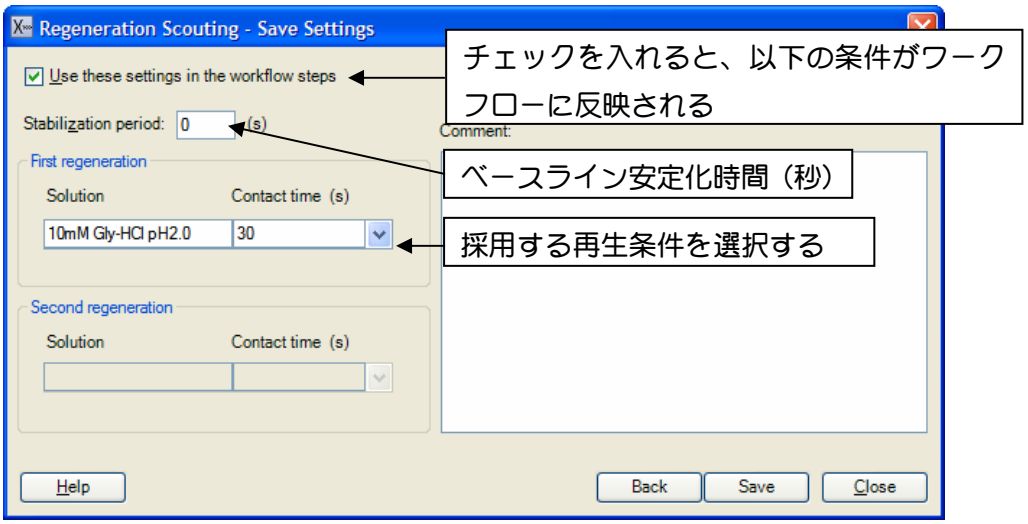


Display・・・　選択しているセンサーグラムの重ね書きが表示される。

Cycles:　測定サイクルの抽出が行える。

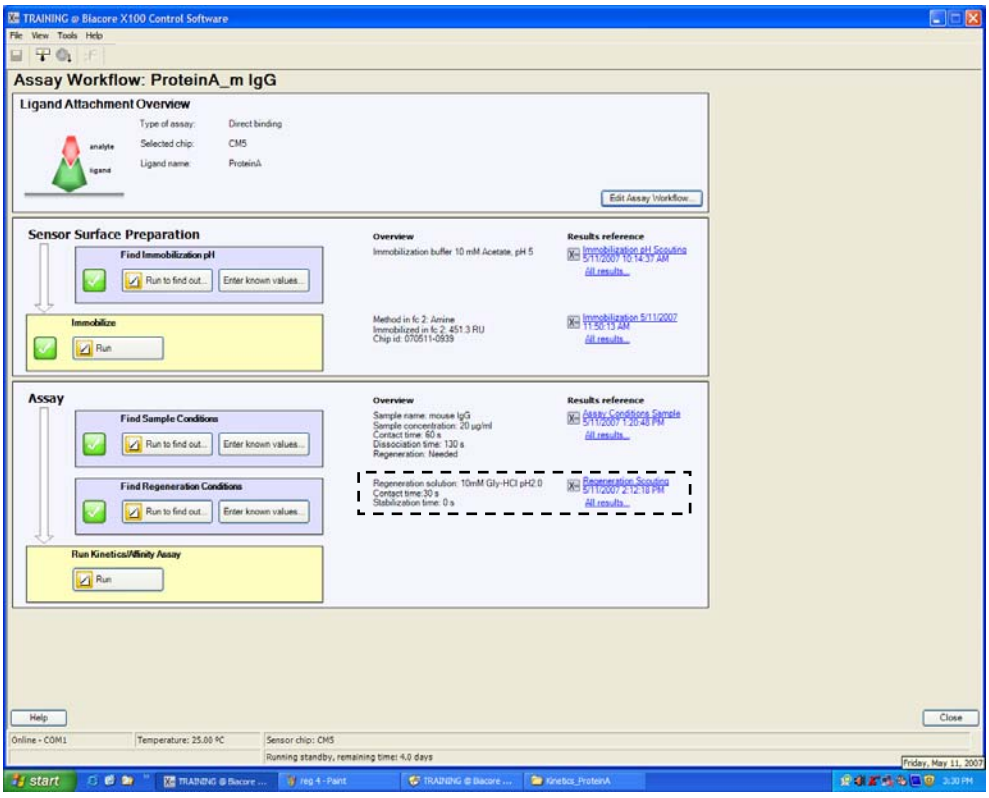
適当な再生条件が見つかれば、**Next>**をクリックする。
（適当な再生条件が見つからない場合は、**Close** をクリックし、再度、再生条件について検討しなおす。）

↓



Save をクリックする。保存条件が最終測定プログラムに反映される。

↓

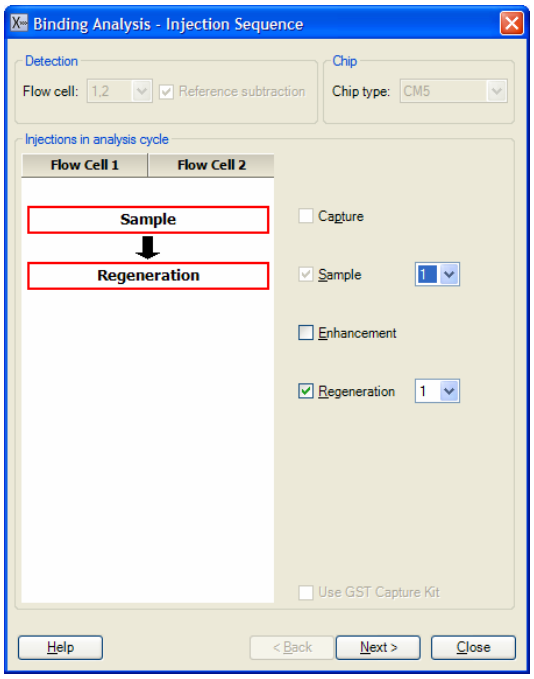


ワークフローシートの、**Assay** → **Find Regeneration Conditions** の **Run to find out…**に（ ☑ ）が入る。**Overview** に再生溶液名、添加時間等が表示される。

5-5. 結合の有無の確認、スクリーニングの実行および解析

Run Binding Analysis Assay → **Run** をクリックする。

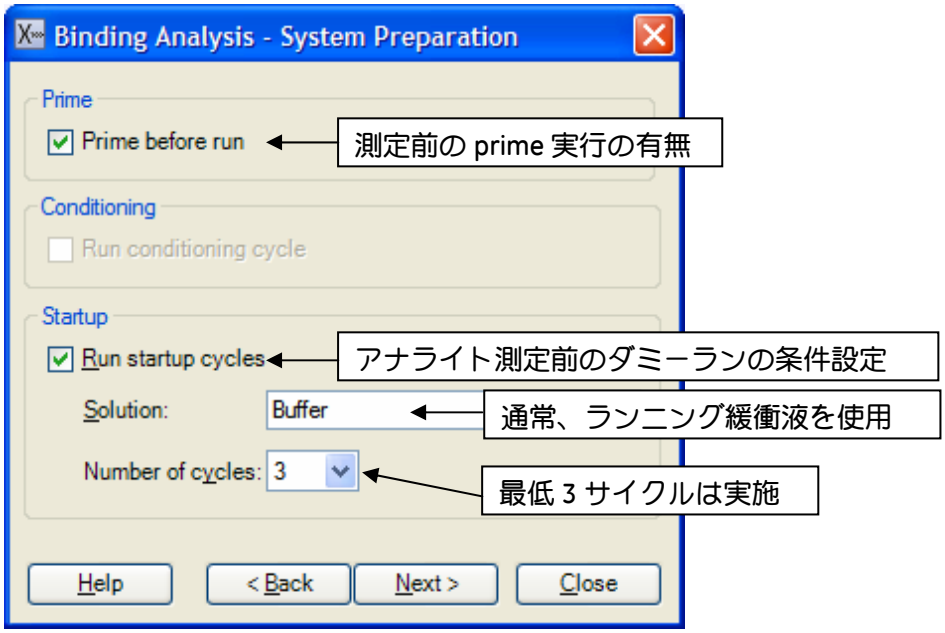
↓



Injection Sequence ダイアログが表示される。ワークフローで決定した条件が自動選択されている。この画面での変更は不可能。

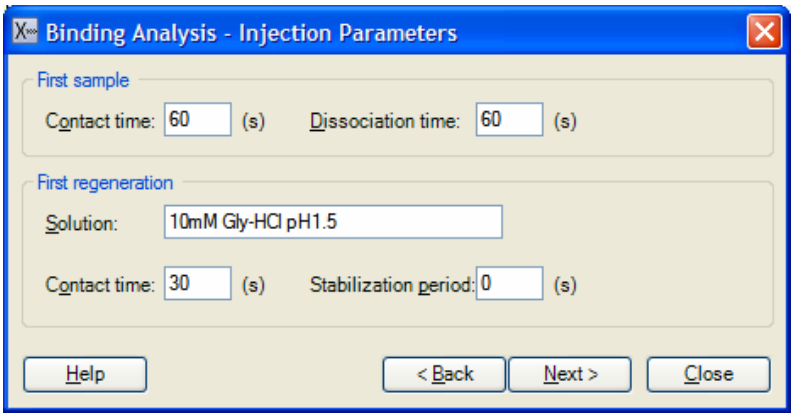
Next>をクリックする。

↓



Next>をクリックする。

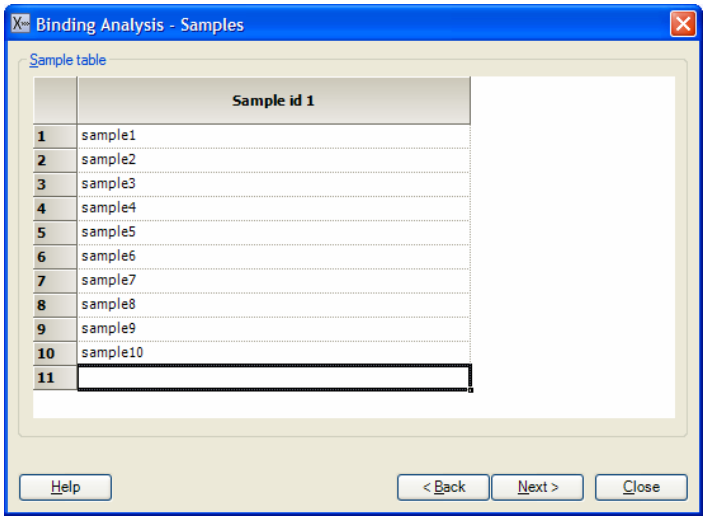
↓



Injection Parameters ダイアログが表示される。ワークフローからウィザードで条件を検討し、決定した場合は、自動入力されている。

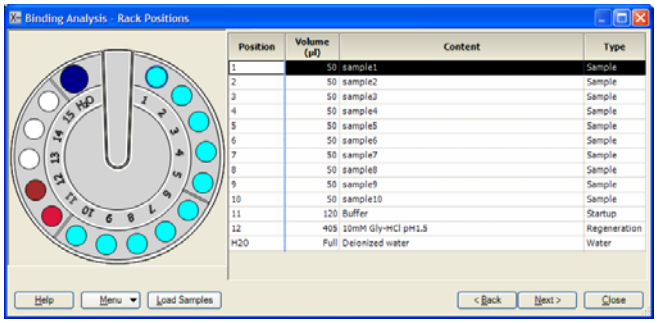
Next>をクリックする。

↓



Sample ダイアログが表示される。**Sample id** に各アナライト名を入力する。

↓



Rack Positions ダイアログが表示される。テーブルに従いサンプルをラックにセットする。

Next>をクリックする。

↓

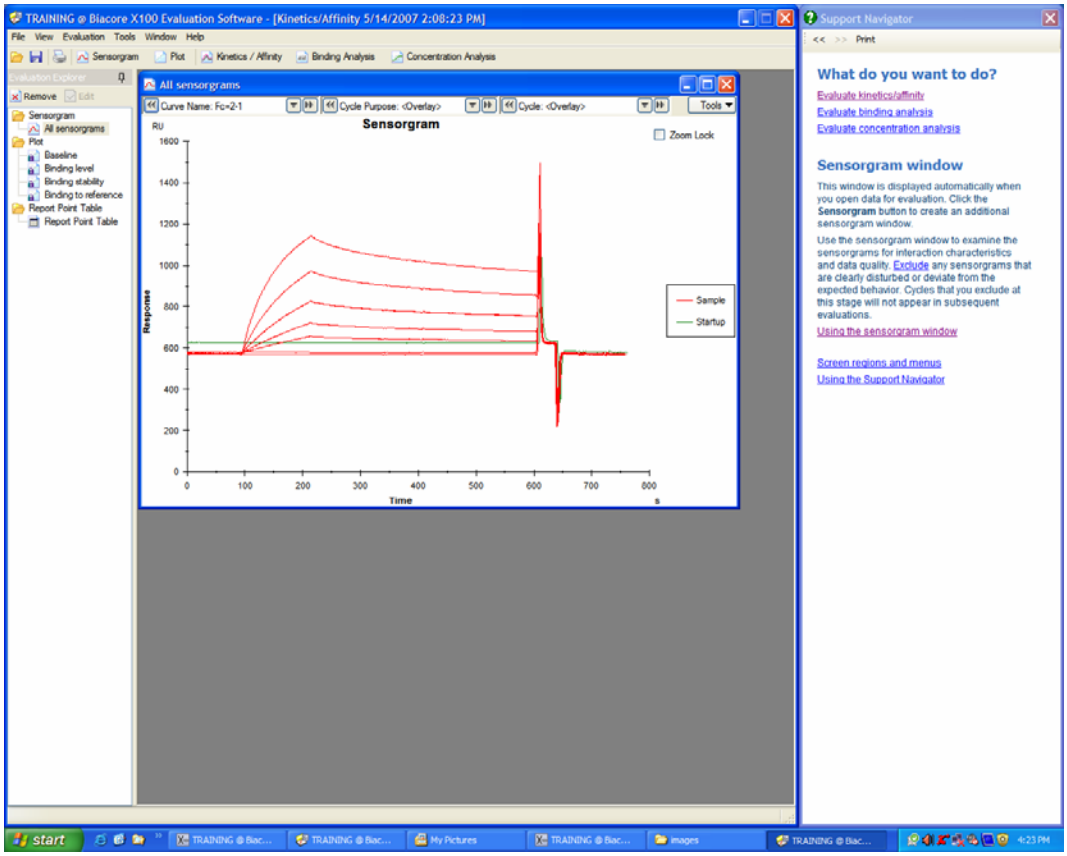
確認画面が表示される。確認後、**Start** をクリックする。

↓

結果の保存先とファイル名を指定後、**Save** をクリックする。測定を緊急停止したい場合は、Ctrl キーと Break キーを同時に押す。補足 5-2.（104 ページ）を参照。

↓

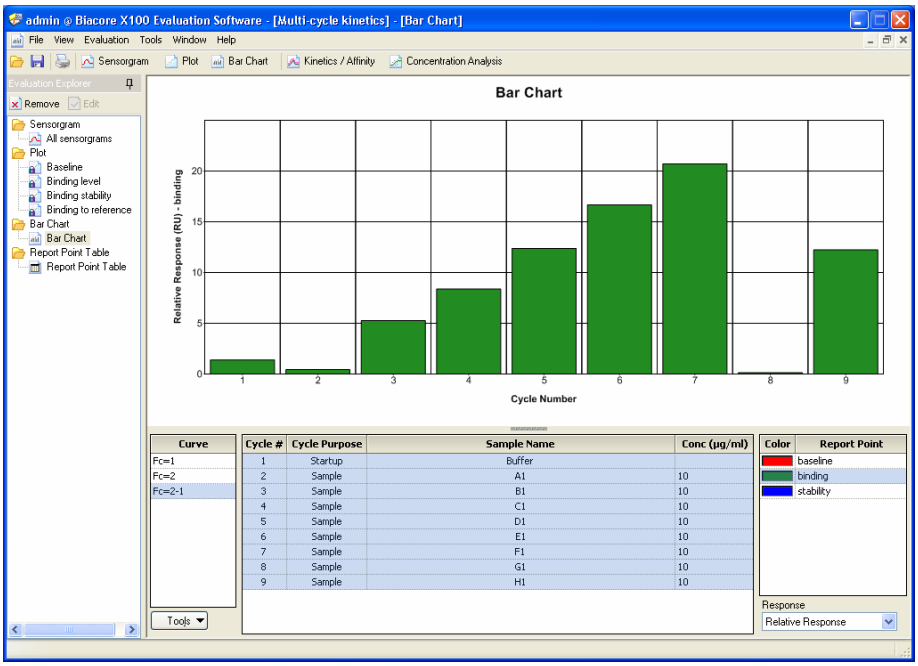
測定が終了すると、装置は **Standby** 状態になる。取得データは自動保存され、Biacore X100 Evaluation Software で開かれる。



↓

ツールバーの Bar Chart をクリックする。

↓



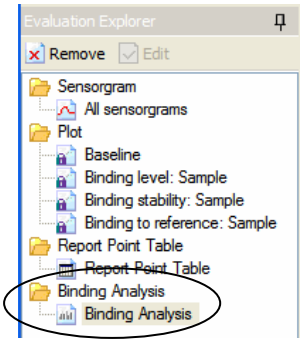
Bar Chart ダイアログが表示される。
全測定サイクル分について、アナライト（ダミーランによる緩衝液添加を含む）添加終了直前の結合レスポンスの棒グラフとテーブルが表示される。

サンプルテーブルで表示するアナライトの選択が行える。ポインターをクリック＆ドラッグして選択するか、キーボードの“Ctrl”キーを押した状態でセルをクリックする。

Cycle #	Sample Name	Conc (µM)
1	Buffer	
2	Buffer	
3	Buffer	
4	sample1	
5	sample2	
6	sample3	
7	sample4	
8	sample5	
9	sample6	
10	sample7	
11	sample8	
12	sample9	

↓

上記解析結果は、画面左端の Evaluation Explorer 中のフォルダーに追加保存される。



6. メンテナンス

システムのメンテナンスは既定のメンテナンスプログラム（メニューバーの **Tools** → **More Tools...** → **Maintenance Tools...**）を実行する。
ランニング緩衝液として、超純水を使用する。また、メンテナンス時はメンテナンス用試薬によりセンサーチップ表面に固定化しているリガンドは変性するため、必ず Sensor Chip Maintenance（もしくは使用済みセンサーチップ）を使用する。
システム温度は 25℃に設定する。

BIA maintenance Kit (BR-1006-66)
メンテナンスに必要な試薬が含まれている。
内容:

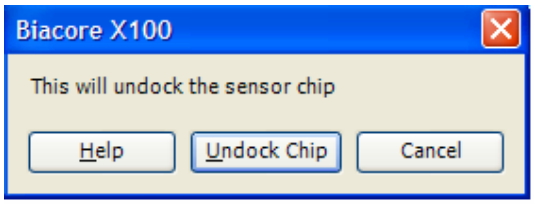
BIAdesorb solution 1	90 ml
BIAdesorb solution 2	90 ml
BIAtest solution	65 ml
BIAdisinfectant solution (conc.)	10 ml
BIAnormalizing solution	30 ml
Sensor Chip Maintenance	1 枚

＊BIAdesorb solution1 は、購入後、室温保存。
＊その他のキット試薬は 4℃保存。

6-1. メンテナンスの準備

実験後にメンテナンスを引き続き実行する場合は、センサーチップの交換が必要である。
メニューバーの **Tools** → **Undock Chip...**またはツールバーのアイコン( )を選択する。

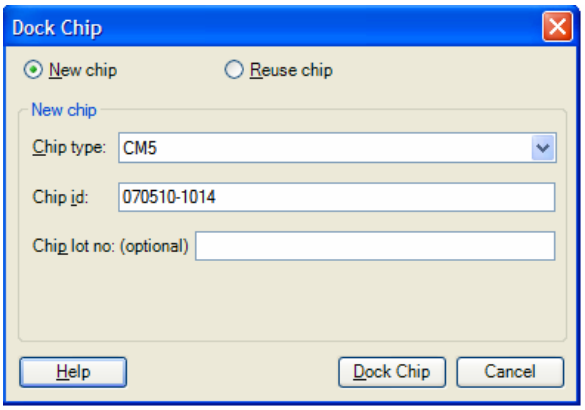
↓



Undock Chip をクリックする。

↓

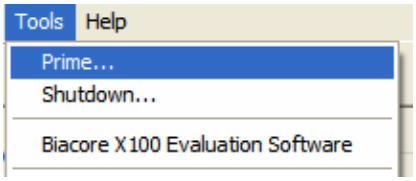
インジケーターの **Sensor chip** が点滅したら、扉を開けセンサーチップを取り出す。メンテナンス用センサーチップ（Sensor Chip Maintenance）をセットする。合わせて、ランニング緩衝液ボトルを超純水ボトルに交換する。



Chip type で **Maintenance** を選択する。Dock Chip をクリックする。Dock が完了すると自動的に **Standby** 状態になる。

↓

メニューバーの **Tools** → **Prime...**を選択する。

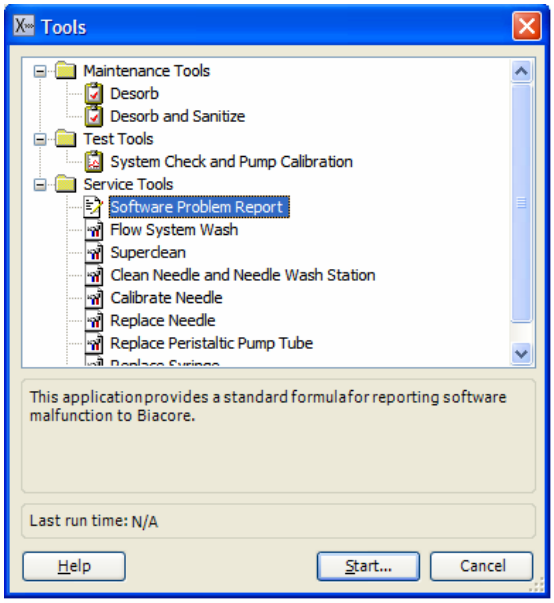


Prime が終了すると、システムは **Standby** 状態になる。

6-2. メンテナンスの実行

メニューバーの **Tools** → **More Tools...**を選択する.。

↓



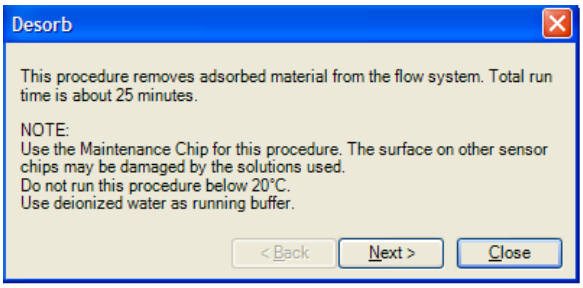
Tools ダイアログが表示される。

6-2-1. Desorb

流路および、サンプルチューブに付着した汚れ等を洗浄する操作。少なくとも、1 週間に 1 回必ず実施する。また、実験者が交代する場合にも実行する。所要時間は、約 25 分。測定温度は、20℃以上で実施すること。

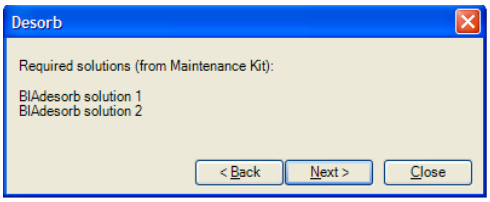
Maintenance Tools → **Desorb** を選択して **Start...**をクリックする。

↓


Desorb
This procedure removes adsorbed material from the flow system. Total run time is about 25 minutes.
NOTE:
Use the Maintenance Chip for this procedure. The surface on other sensor chips may be damaged by the solutions used.
Do not run this procedure below 20°C.
Use deionized water as running buffer.
< Back
Next >
Close

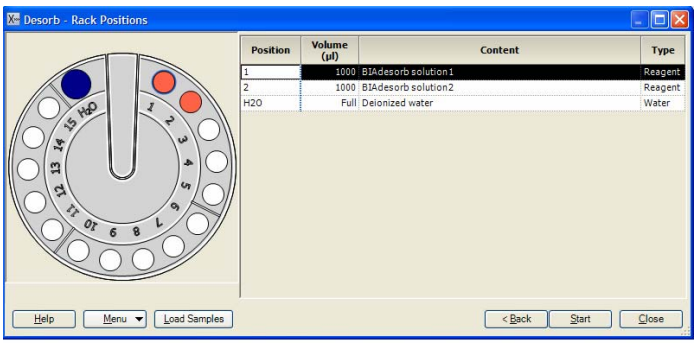
内容を確認後、**Next>** をクリックする。

↓



内容を確認後、**Next>** をクリックする。

↓



BIAdesorb solution 1 および、BIAdesorb solution 2 を、それぞれ 1.5 ml プラスチックバイアルに 1,000 µl 分注して指定のポジションにセットする。15 mm プラスチックバイアルに超純水を 4 ml 入れ、ポジション H2O にセットする。**Start** をクリックする。

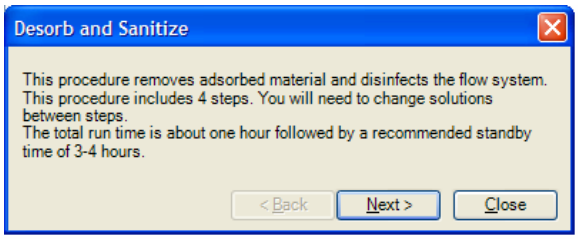
Desorb が終了した後、装置は自動的に **Standby** 状態になる。**Standby** 状態で 3～4 時間放置する。**Close** をクリックし終了する。

6-2-2. Desorb and Sanitize

全てのフローシステムの滅菌および、洗浄を行う操作。1 ヶ月に 1 回必ず実施する。所要時間は、約 1 時間。測定温度は、20℃以上で実施すること。

Maintenance Tools → **Desorb and Sanitize** を選択して **Start…**をクリックする。

↓


Desorb and Sanitize
This procedure removes adsorbed material and disinfects the flow system.
This procedure includes 4 steps. You will need to change solutions between steps.
The total run time is about one hour followed by a recommended standby time of 3-4 hours.
< Back
Next >
Close

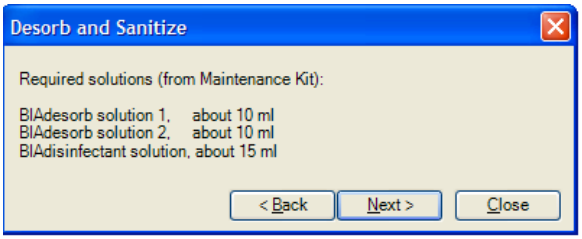
内容を確認後、**Next>** をクリックする。

↓

Desorb and Sanitize
NOTE:
Use the Maintenance Chip for this procedure. The surface on other sensor chips may be damaged by the solutions used.
Do not run this procedure below 20°C.
Do not abort this procedure after it is started.
< Back
Next >
Close

内容を確認後、**Next >**をクリックする。

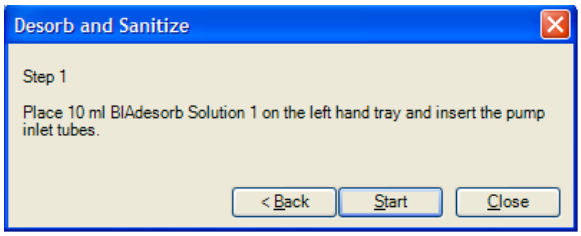
↓


Desorb and Sanitize
Required solutions (from Maintenance Kit):
BIAdesorb solution 1, about 10 ml
BIAdesorb solution 2, about 10 ml
BIAdisinfectant solution, about 15 ml
< Back
Next >
Close

内容を確認後、**Next>** をクリックする。

↓

ステップ 1；

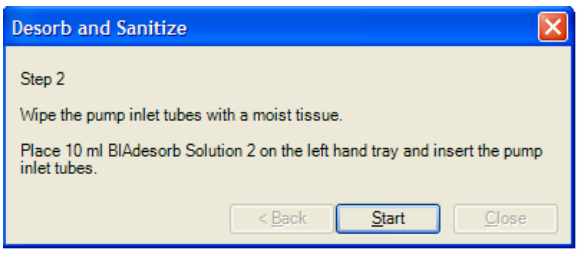

Desorb and Sanitize
Step 1
Place 10 ml BIAdesorb Solution 1 on the left hand tray and insert the pump inlet tubes.
< Back
Start
Close

本体左側のランニング緩衝液用インレットチューブ 2 本を、BIAdesorb Solution 1 ボトル（10 ml）にセットする。**Start** をクリックする。所要時間 8 分程度。

↓

ステップ 1 終了後、自動的にステップ 2 のダイアログが表示される。

ステップ 2 ；

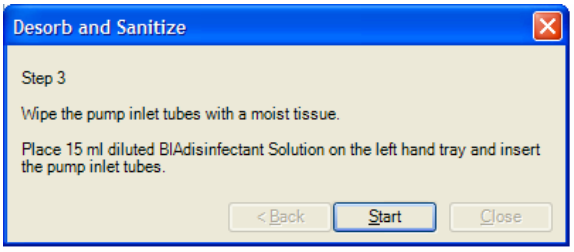


本体左側のランニング緩衝液用インレットチューブ 2 本を、BIAdesorb Solution 2 ボトル（10 ml）にセットする。**Start** をクリックする。所要時間 7 分程度。

↓

ステップ 2 終了後、自動的にステップ 3 のダイアログが表示される。

ステップ 3 ；

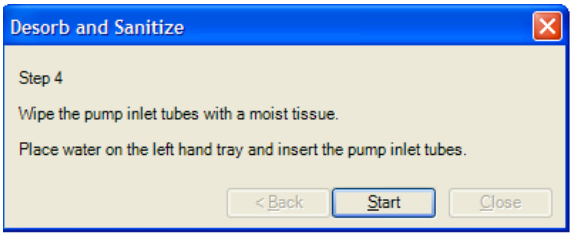


本体左側のランニング緩衝液用インレットチューブ 2 本を、希釈した BIAdisinfectant Solution（原液 1.5 ml＋超純水 20 ml）ボトルにセットする。**Start** をクリックする。所要時間 23 分程度。

↓

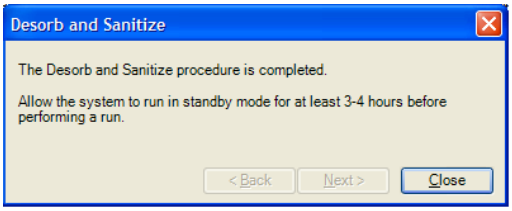
ステップ 3 終了後、自動的にステップ 4 のダイアログが表示される。

ステップ 4 ；



本体左側のランニング緩衝液用インレットチューブ 2 本を、超純水ボトルにセットする。**Start** をクリックする。所要時間 13 分程度。

↓



ステップ 4 終了後、装置は自動的に **Standby** 状態になる。**Standby** 状態で 3～4 時間放置する。**Close** をクリックし終了する。

6-3. システムチェックとポンプキャリブレーション

システムチェックおよびポンプキャリブレーションを行うプログラムである。このプログラムは Desorb and Sanitize による洗浄後に実行する。シグナルのドリフトや、エアースパイクの混入が激しい場合等に実施する。所要時間は、約 35 分。使用頻度が高い場合、定期的に実行することを推奨する。

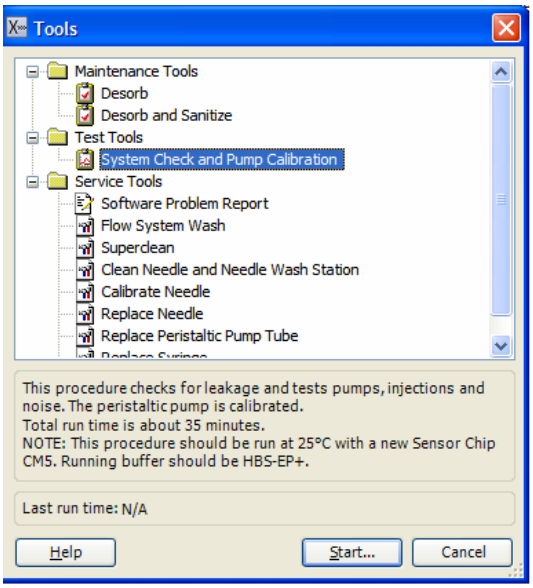
（準備品）

- BIAtest solution
- HBS-EP＋ 10X (BR-1008-26)
- 新品の Sensor chip CM5

HBS-EP+をランニング緩衝液としてセットし、新品のセンサーチップ CM5 を **Dock** し、**Prime** を実行する。

メニューバーの **Tools** → **More Tools...**を選択する

↓


Tools
Maintenance Tools
Desorb
Desorb and Sanitize
Test Tools
System Check and Pump Calibration
Service Tools
Software Problem Report
Flow System Wash
Superclean
Clean Needle and Needle Wash Station
Calibrate Needle
Replace Needle
Replace Peristaltic Pump Tube
This procedure checks for leakage and tests pumps, injections and noise. The peristaltic pump is calibrated.
Total run time is about 35 minutes.
NOTE: This procedure should be run at 25°C with a new Sensor Chip CM5. Running buffer should be HBS-EP+.
Last run time: N/A
Help
Start...
Cancel

Test Tools → **System Check and Pump Calibration** を選択して **Start...**をクリックする。

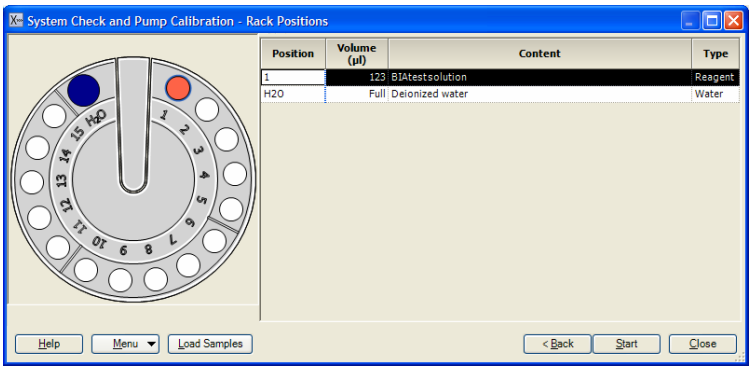
↓

System Check and Pump Calibration
Ensure that you have HBS-EP+ as running buffer, the analysis temperature is 25°C and a new Sensor Chip CM5 is docked.
< Back
Next >
Close

ランニング緩衝液は、HBS-EP＋（HBS-EP＋ 10X を 10 倍希釈）をセットする。

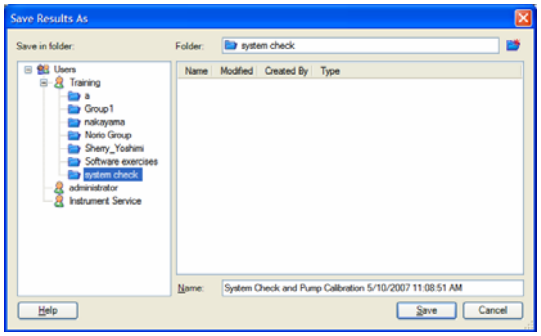
Next> をクリックする。

↓



BIAtest Solution を、1.5 ml プラスチックバイアルに 123 µl 分注してポジション 1 にセットする。また、ポジション H2O に超純水を 4 ml セットし、**Start** をクリックする。

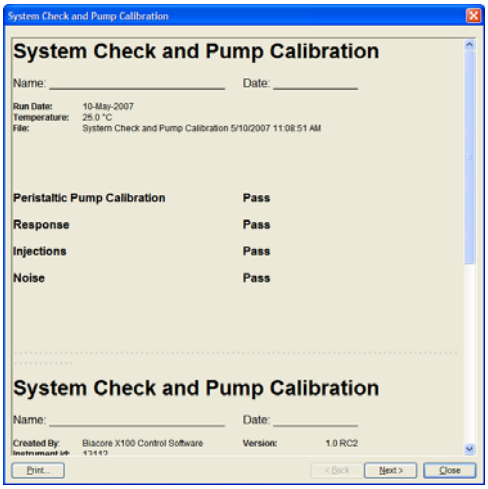
↓



続いて、測定結果の保存先を設定する。**File name** を入力して、**Save** をクリックすると測定がスタートする。

↓

測定が終了すると、以下のシートが現れる。



4 つのチェック項目について測定値が正常値範囲内であれば“**Pass**”が表示される。問題があれば“**Fail**”と表示される。**Fail** が表示されている場合には弊社技術サービス部に連絡する。

7. シャットダウン

7-1. 実験の終了

実験が終了した際には、次の 2 つの方法の何れかでシステムを維持する。
① **Standby** 状態での放置
② 電源を落として終了
7 日以内に使用する場合には、①の Standby 状態。
7 日以上使用しない場合には、超純水で洗浄後、②の電源を落として終了する。

7-1-1. Standby 状態での放置

測定を終了すると自動的に **Standby** 状態になる。
セットしたランニング緩衝液で、最長 7 日間継続する。ランニング緩衝液は 200 ml 必要。
ランニング緩衝液を涸らさないように注意する。廃液ボトルの空き容量にも注意する。

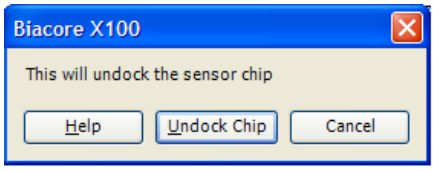
ステータスバー ；

Online - COM1	Temperature: 25.00 °C	Sensor chip: CM5
		Running standby, remaining time: 7.0 days

7-1-2. 電源を落として終了

メニューバーの **Tools** → **Undock Chip** またはツールバーのアイコン（ ）を選択する。

↓

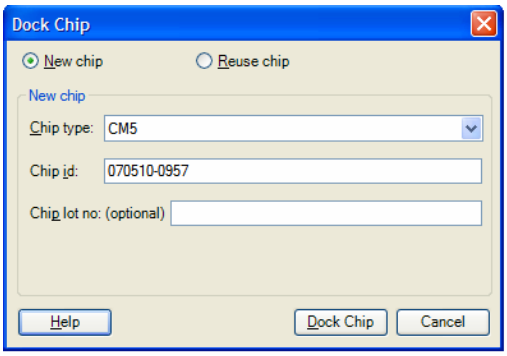


Undock Chip をクリックする。

↓

インジケーターの **Sensor chip** が点滅したら、扉を開けセンサーチップを取り出す。メンテナンス用センサーチップ（Sensor Chip Maintenance）をセットする。合わせて、ランニング緩衝液ボトルを超純水ボトルに交換する。

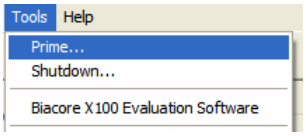
↓



Chip type:で Maintenance を選択し、**Dock Chip** をクリックする。

↓

メニューバーの **Tools** → **Prime...**を選択する。

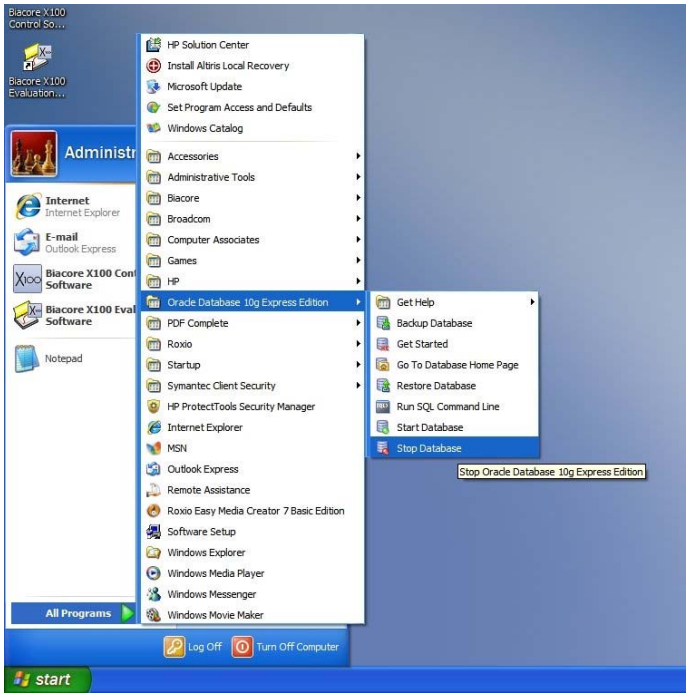


↓

Prime 終了後、再びセンサーチップを Undock して、BiacoreX100 control software を **Exit** する。

↓

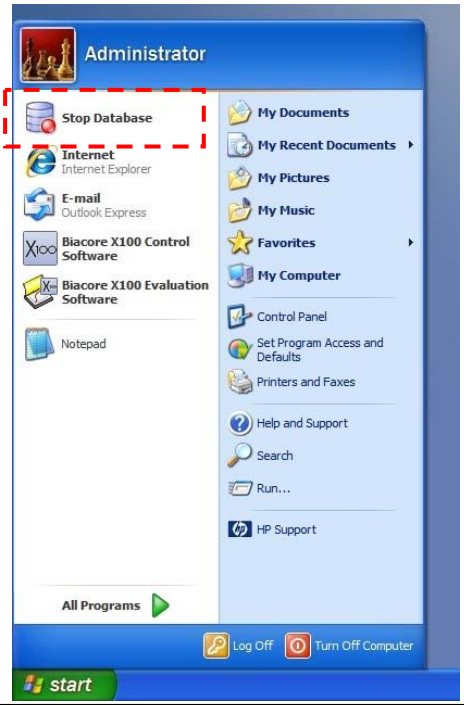
モニター画面左下の **Start** をクリックして、**All Programs/ Oracle Database 10g Express Edition/ Stop Database** を実行する。



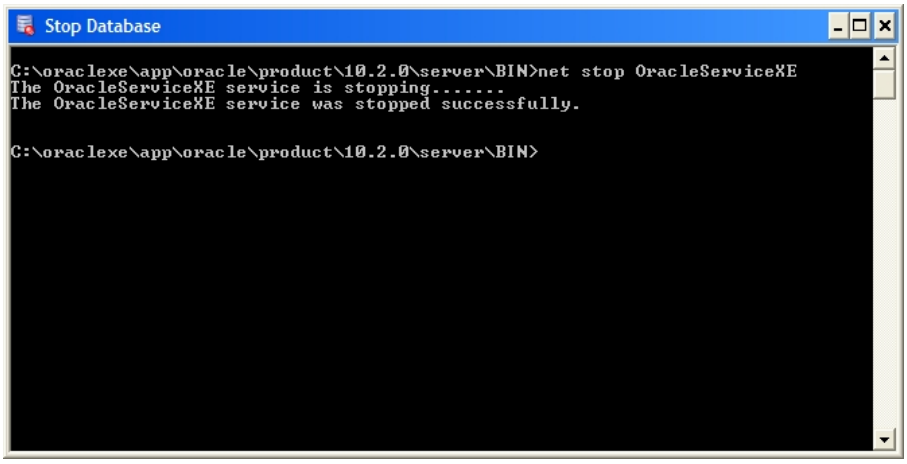
補足 7-1. Stop Database のコピー

Stop Database のプログラムは階層が複雑だが、スタートメニューの **All Programs/ Oracle Database 10g Express Edition/ Stop Database** アイコンをクリック＆ドラッグで右図の場所（スタートメニュー）にコピーできる。

もしくは、ショートカットキーをデスクトップに作成しておくとわかりやすい。



DOS ウインドウが表示され、『Oracle Database の終了』が始まり、数十秒後に「The OracleServiceXE service was stopped successfully.」と表示される。その後、右上のクローズドボックスをクリックして DOS ウインドウを閉じる。



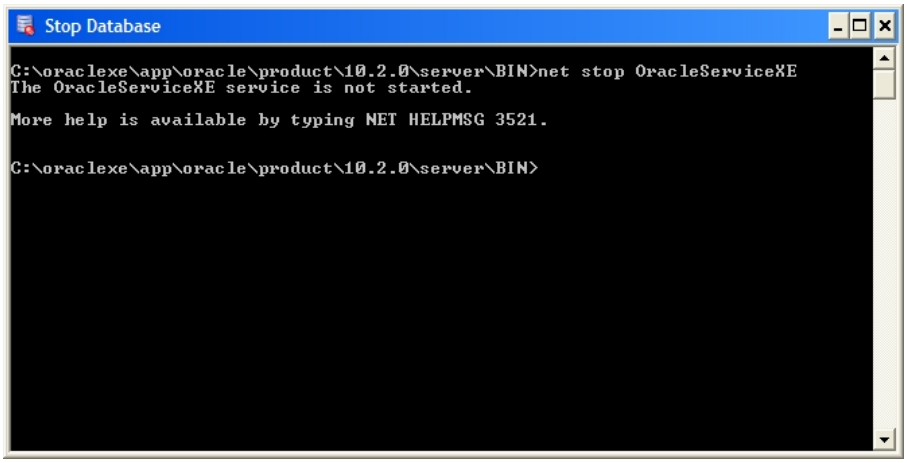
↓

モニターの初期画面中の左下のスタートメニューから、Windows を **Shutdown** する。Biacore X100 本体電源を落とした後、装置前面のパネルを開け、ペリスターポンプのカバーを開けた状態にする。

（次回 PC 起動時には、自動的に Oracle Database が再スタートする。）

補足 7-2. Oracle Database がバックアップ中の挙動

Stop Database を実行した際、Oracle Database のバックアップ中には自動的に Oracle Database が終了しているため次の DOS ウインドウが表示される。


Stop Database
C:\oraclexe\app\oracle\product\10.2.0\server\BIN>net stop OracleServiceXE
The OracleServiceXE service is not started.
More help is available by typing NET HELPMSG 3521.
C:\oraclexe\app\oracle\product\10.2.0\server\BIN>

このウインドウが表示された場合は、Oracle Database のバックアップが終了するまで待ち（約 6 分間）、再度 **Stop Database** を正常に実行する。

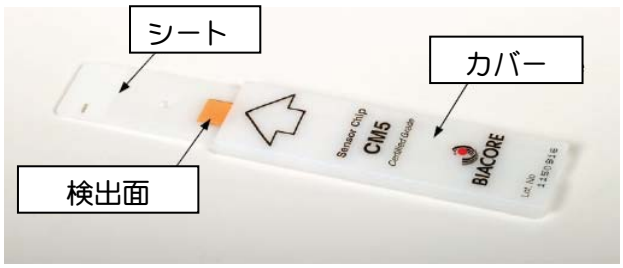
7-2. センサーチップの保存

取り出したセンサーチップは、以下の方法で保存することができる。
保存中にリガンドが変性する場合があるので、再使用の際にはリガンドの活性を確認すること。

① ドライ状態での保存
取り出したセンサーチップにパラフィルムを巻いて 4 ℃で保存する。

② ウェット状態での保存
取り出したセンサーチップのシート部分をカバーから抜き取り、シートだけを、容器（50 ml 容のふた付きプラスチック管等）に分注した HBS-EP+等の緩衝液に浸し、4 ℃で保存する。

シートの取り出しと保存
センサーチップはカバーとシートから構成されている。



ピンセットを用いてシートを抜き出し、緩衝液に浸して保存する。

シートからの緩衝液成分の除去とカバーへの収納
再利用する際は、シートの水分を取り除いてからカバーに収める。
シート金膜の窪んでいる面はリガンド固定化面で、平らな面は検出面である。

プラスチックの部分および検出面	キムワイプで拭き、超純水で湿らせたキムワイプで再度拭く。さらに乾いたキムワイプで拭き、水分を取り除く。
固定化面	キムワイプを“こより状”に細くして、金膜の中央部分を触らないように四隅から緩衝液を吸い取る。

埃に注意しながらカバーに収める。検出面が表になる向きで、ピンセットでカバーに挿入する。（固定化面を表にして挿入した場合には最後までシートが入らない。

8. センサーグラムの編集

ウィザードを用いた測定プログラム終了後、BiacoreX100 Evaluation Software は自動的に立ち上がり、取得データは編集・解析に向け開かれる。過去に取得したデータを編集解析する場合は、Evaluation ソフトウェアを起動し、ファイルの呼び出しから行う。

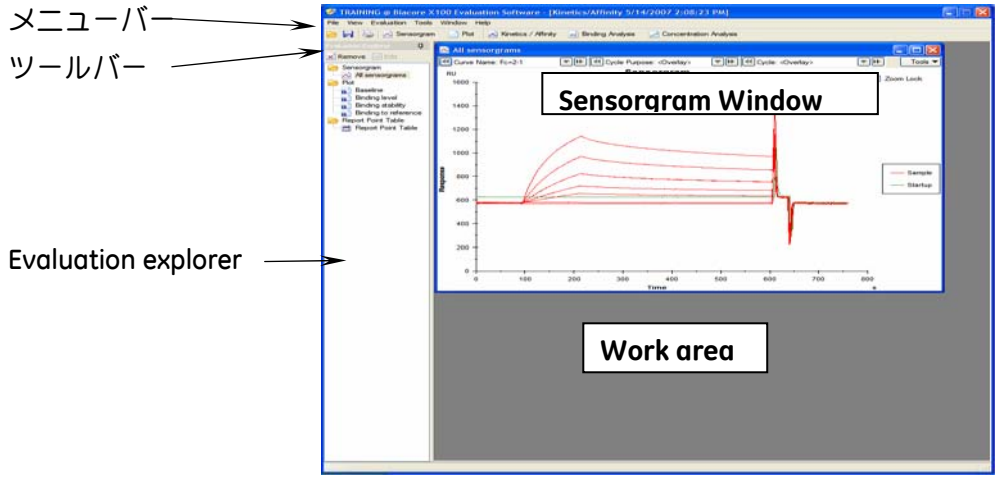
8-1. 解析用ソフトウェアの起動

Windows 画面左下の **Start** メニュー→ **Programs** または **All Programs** → **Biacore** → **Biacore X100 Evaluation Software** をクリックする。

8-2. ファイルの呼び出し

もしくは **File** → **Open…**をクリックし、目的ファイルを選択し **OK** をクリックする。

補足 8-1. 画面の説明



メニューバー・・・　すべての作業コマンドを含む各種メニュー表示

ツールバー・・・　使用頻度の高い作業コマンドをアイコン化して表示

Evaluation Explorer・・・　すべての測定データ、解析後のデータの表示

- Sensorgram　測定により取得したセンサーグラム
- Plot　測定時に取得したレポートポイント名別のプロット
  - Baseline　サンプル添加直前の AbsResp
  - Binding level　サンプル添加時の Baseline からの RelResp
  - Binding stability　サンプル添加直後の Baseline からの RelResp
  - Binding to reference　リファレンスセルに対する Binding level
- Report Point Table　測定により取得したレポートポイントのテーブル

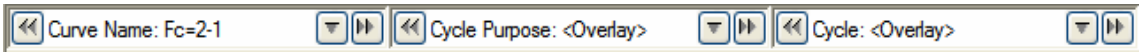
Work area・・・　Evaluation Explorer で選択したファイルを表示

8-3. センサーグラムの編集

Evaluation explorer でSensorgramフォルダから、All sensorgramsをクリックし、Work area内に Sensorgram window を表示する。

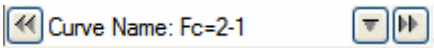
8-3-1. センサーグラムの表示

Sensorgram window 上部のセレクションツール



を使用する。

フローセル別センサーグラムの選択



の◀◀もしくは▶▶をクリックし、目的のフローセルを選択する。

複数のフローセルを同時に選択する場合は、▼を使用する。

Curve Name	Curve Type
Fc=1	Reference
Fc=2	Active
Fc=2-1	ReferenceSubtracted

キーボードの"Ctrl"キーを押しながら、目的のフローセルをクリックする。連続したフローセルを選択する場合は、マウスのドラッグ操作によっても可能である。

特定のセンサーグラムの選択

の◀◀もしくは▶▶をクリックし、目的のサイクルを選択する。

↓

複数のサイクルを同時に選択する場合は、▼を使用する。

Included	Cycle#	Cycle Purpose	Sample Name	Conc.	MW
Yes	1	Startup	Buffer		
Yes	2	Startup	Buffer		
Yes	3	Startup	Buffer		
Yes	4	Sample	b2-micro low		
Yes	5	Sample	b2-micro high		
Yes	6	Sample	b2-micro low		
Yes	7	Sample	b2-micro high		

キーボードの"Ctrl"キーを押しながら、目的のサイクルをクリックする。連続したフローセルを選択する場合は、マウスのドラッグ操作によっても可能である。

8-3-2. センサーグラムの表示の変更

Sensorgram window 上部のセレクションツールの左端にある Tools を使用する。

色の表示の変更

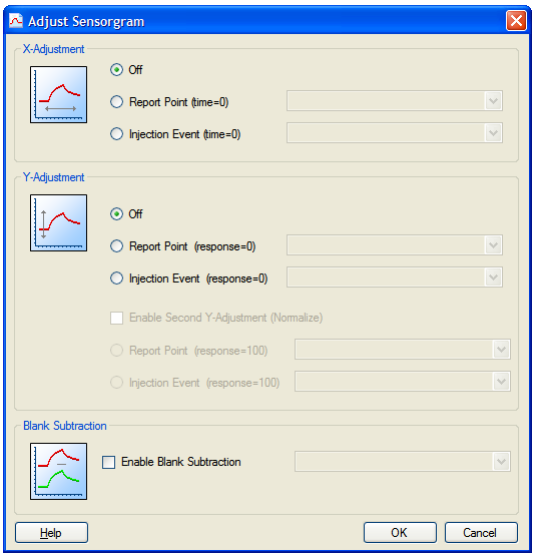
Tools → **Color By** → **Sample** をクリックする。
サンプル名ごとに、自動的にセンサーグラムの色が変更され、表示される。
その他、測定温度ごとやフローセルごとにも色を変更し表示することが可能である。

レポートポイントの表示

Tools → **Report Point** → **Id and Marker** をクリックする。

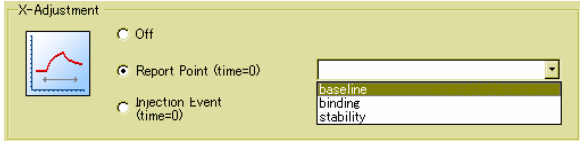
8-3-3. サンプル添加開始時間、ベースライン合わせ

Sensorgram window 上部のセレクションツールの左端にある Tools を使用する。
Tools → **Sensorgram Adjustment…**をクリックする。



↓

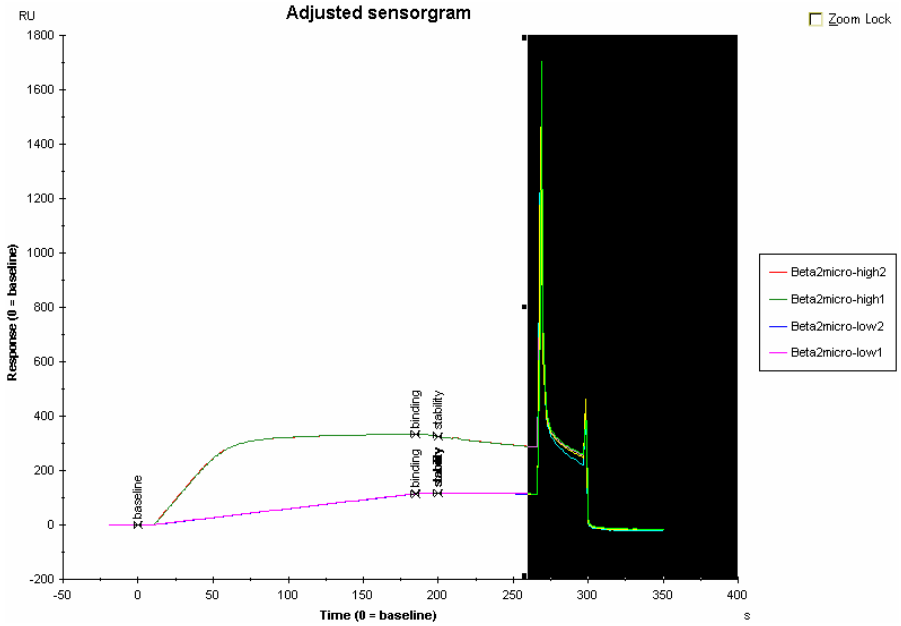
X-Adjustment に Report point (time=0)をクリックし、 で baseline を選択する。



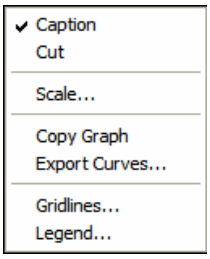
Y-Adjustment も同様に、Report point (response=0)をクリックし、 で baseline を選択する。
OK をクリックする。

8-3-4. センサーグラムの不必要部分の削除

削除する範囲をマウスの右ボタンをクリック＆ドラッグし選択する。

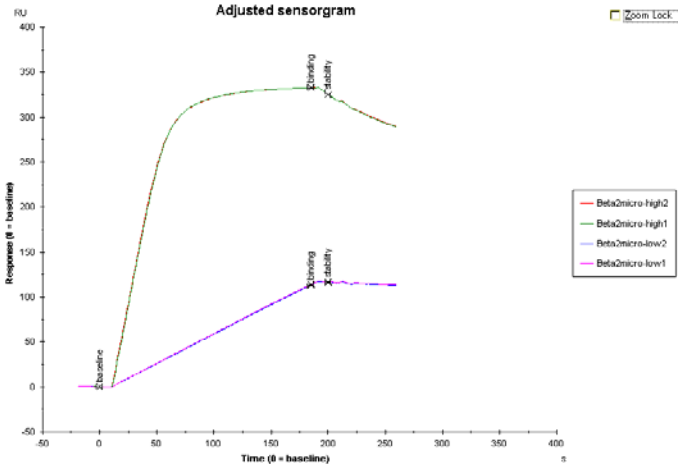


Sensorgram window 上でマウスの右ボタンをクリックする。



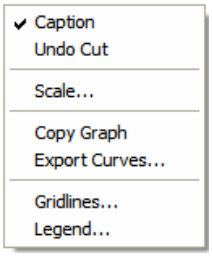
Cut をクリックする。

↓



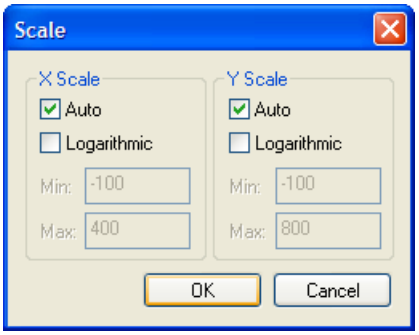
8-4. グラフの編集

Sensorgram window 上でマウスの右ボタンをクリックして表示される作業コマンドを使用する。

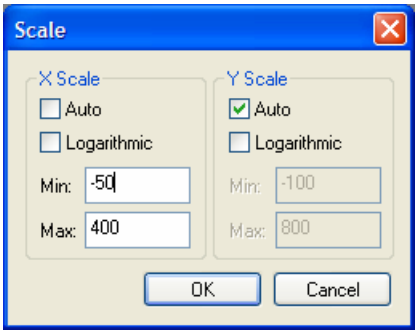


スケールの変更

Scale…



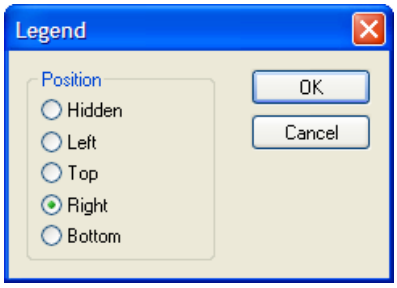
通常 Auto が選択されている。スケールを変更する場合は、Auto のチェックを外し、各軸のスケールの最小値(Min:)と最大値(Max:)を入力する。



OK をクリックする。

凡例の移動と削除

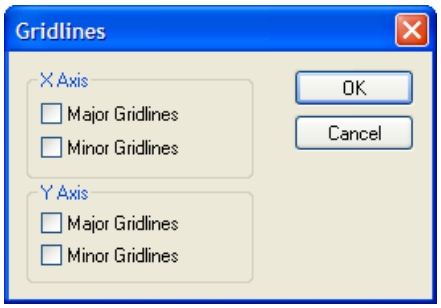
Legend…



通常 Right が選択されている。凡例の位置はグラフの上下左右に配置することができる。
移動する位置を選択し、**OK** をクリックする。
凡例を表示しない場合は、Hidden を選択する。
OK をクリックする。

マス目の表示

Gridlines…



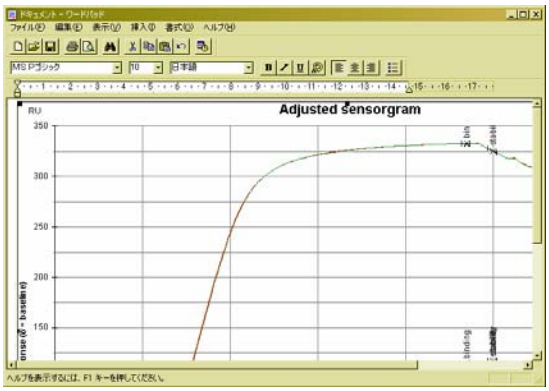
大小二種類のマス目を入れることができる。
大きいマス目を表示するときは Major Gridlines、小さいマス目を表示するときは Minor Gridlines にチェックを入れる。
OK をクリックする。

8-5. グラフの貼り付け

Sensorgram window 上でマウスの右ボタンをクリックして表示される作業コマンドを使用する。

Copy Graph
グラフを画像としてコピーする。続いて Biacore 付属のパソコンにインストールされている Word Pad、Paint などに貼り付け、貼り付けたファイルを保存する。保存したファイルは、画像として別のパソコンに移動させることが可能となる。

（例）Word Pad への貼り付け



8-6. データの移管

センサーグラムの移管

Sensorgram window 上でマウスの右ボタンをクリックして表示される作業コマンドを使用する。

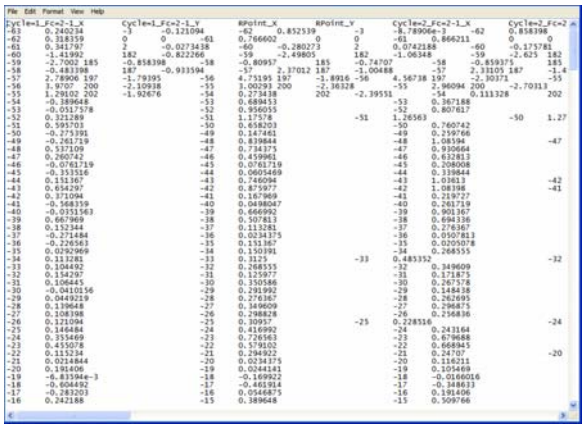
Export Curves...をクリックする。

↓

保存先を指定する。

全てのセンサーグラムをテキスト形式で保存する（拡張子：txt）。保存したファイルは、他のパソコンの Microsoft Excel 等のグラフ化ソフトウェアで再びセンサーグラムを作成することが可能である。

（例）保存した text ファイル



解析データの移管

File → Export → Result To Excel...

↓

保存先を指定する。

Evaluation Explorer に表示されている解析結果をテキスト形式保存する（拡張子：xls）。他のパソコンの Microsoft Excel で解析結果を開くことができる。

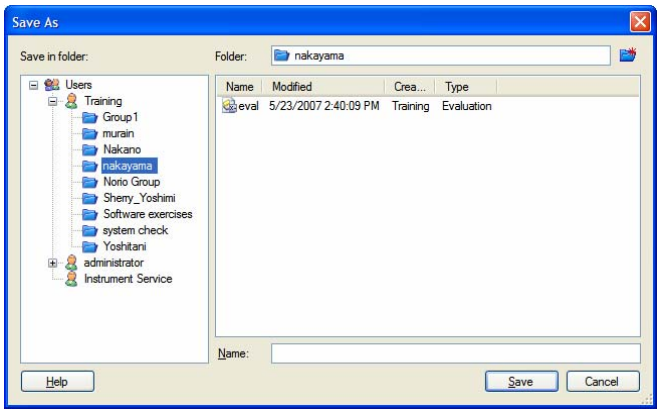
（例）保存した xls ファイルを Microsoft Excel で開いた例

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1	Evaluation	Kinetics / Affinity												
2	Name:	Sample												
3														
4	Sample:	Sample												
5	Temperatu	25												
6	Curve:	Fc=2-1												
7														
8	Model:	Bivalent Analyte												
9	Description:													
10														
11	Curve	ka1 (1/Ms)	kd1 (1/s)	ka2 (1/RUs	kd2 (1/s)	Rmax (RU)	Conc (M)	tc	Flow (ul/mkt	(RU/Ms)	RI (RU)	Chi² (RU²)	U-value	
12		28071.45	0.019845	0.000287	0.06355	15688.84		3764036				2643.192	N/A	
13	Cycle: 2						2.4E-09		30	11695736	2.114536			
14							1.2E-08				9.153725			
15							6E-08				58.73426			
16							3E-07				219.0913			
17							1.5E-06				274.0177			
18														
19														
20														

8-7. データの保存

解析およびセンサーグラムの編集後に結果の保存を行う。

File →Save As…をクリックする。



保存先を選択し、**Name:**にファイル名を入力し、**Save** をクリックする。

9. ユーザー管理

9-1. ユーザー管理

ユーザーグループは、"**Administrators**"（管理者）と"**Users**"（使用者）に分けられる。
初期状態では、1 名の Administrator が設定されている。

Username: **admin**

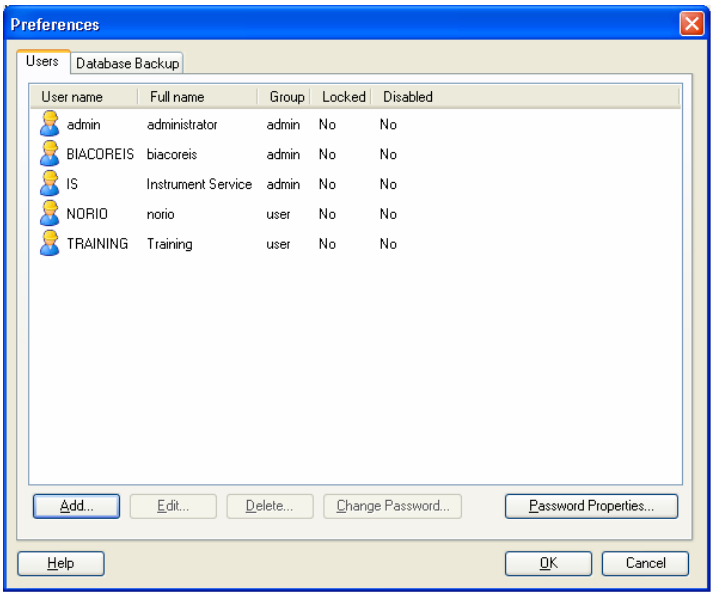
Password: **administrator**

各使用者を個別の User として登録することを推奨する。

Administrators グループ・・・　ユーザーアカウントの作成およびパスワードの設定、データのバックアップの設定変更が行える。データ（フォルダー）の削除には制限がない。

Users グループ・・・　"Administrators"（管理者）が作成する"ユーザー名"のフォルダー（個人用）内にのみ測定データを保有できる。他ユーザーのデータ閲覧には制限がない。ユーザー権限で作成したデータのみ削除可能。管理者および他ユーザーが作成したデータの削除は不可能。

ユーザー管理は、Biacore X100 Control Software を"**Administrators**"権限で立ち上げた場合のみ有効となる。メニューバーの **Tools** → **Preferences** で行う。**Users** タブをクリックする。



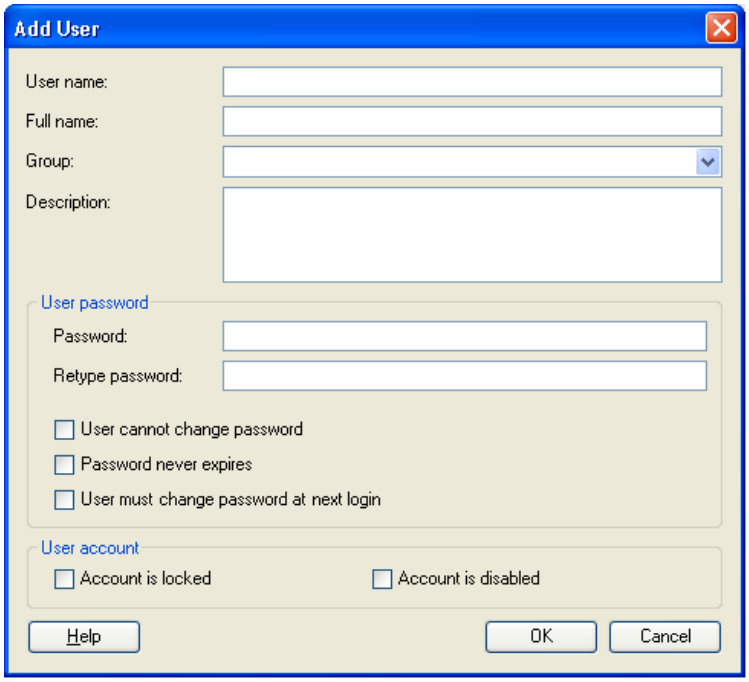
パスワードの詳細設定を行う場合には、**Password Properties...**をクリックする。
次項目の設定が行える。

・パスワードの最小文字数
・パスワード変更の期間
・パスワードの有効期限を督促する日数

（Add User ダイアログで、□Password never expires にチェックを入れた場合には無効となる。）

新規にユーザーアカウントを作成する場合には、**Add...**をクリックする。

↓



User name:　ユーザーネーム（必須）

Full name:　ユーザーのフルネーム（必須）

Group:　プルダウンメニューで、 "Administrators"または、"Users"の選択を行う

Description:　必要に応じて入力する

User password・・・

Password:　パスワード（必須）

パスワードの取り扱いオプションにチェックを入れる

☐User cannot change password

ユーザーによるパスワードの変更を無効にする場合にチェックを入れる

☐Password never expires

パスワードに有効期限を設けない場合にチェックを入れる。

常に、チェックを入れ無期限の設定を行うことを推奨する。

☐User must change password at next login

チェックを入れると、ユーザーが初回ログインした際にパスワードの変更を行う。（パスワードの管理は、ユーザーが行う。）

User account・・・

☐Account is locked

チェックは入れない。

☐Account is disabled

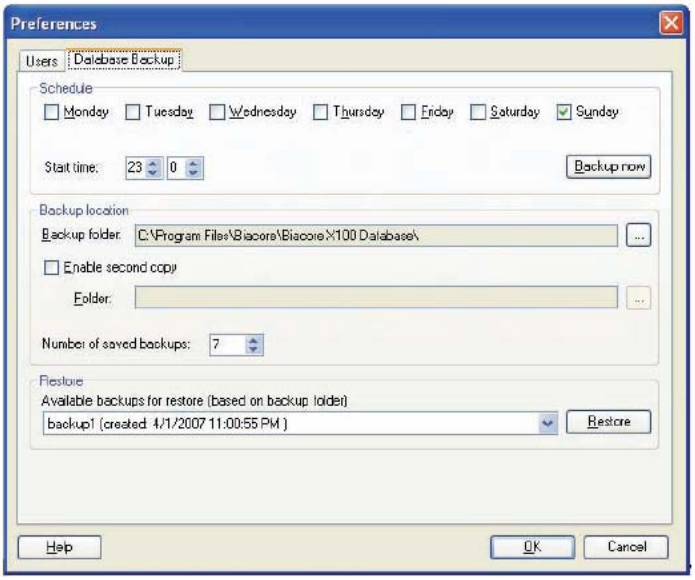
アカウントを無効にする場合にチェックを入れる。(フォルダーは存在する。)

設定終了後、**OK** をクリックする。

9-2. データバックアップの設定

Biacore X100 Control ソフトウェアおよび Biacore X100 Evaluation ソフトウェアで保存したデータは、全て"**Oracle Database 10g Express Edition**"のサーバー内に保存される。
初期設定では、毎週日曜日　23 時から自動バックアップされる。"**Administrators**"（管理者）のみ、設定の変更が行える。なお、バックアップ中には測定を行わないことを推奨する。
注）ハードディスクの空き容量として約 2GB が必要となる。
Biacore X100 Control Software のメニューバーの **Tools** → **Preferences** の **Database Backup** タブをクリックする。

↓



Schedule・・・

曜日を指定

Start time:　開始時間を指定

Backup location・・・

Backup folder:　バックアップ先を指定。
初期状態では、C:/ProgramFiles/Biacore/ BiacoreX100 Database/ が設定されている。

☐Enable second copy

別途、ネットワークドライブ等へバックアップが可能。実施を推奨する。

Number of saved backups:

バックアップの最大数の指定。（デフォルトは 7）バックアップ数が指定した数に達している場合、新たにバックアップを行うと古いバックアップが削除される。

注）

測定中にバックアップが実行された場合、測定データは一時的に C:ドライブに保存される。測定終了後、ソフトウェアの再起動行う。一時保存したデータをデータベースにインポートするための確認画面が表示される。画面に従いインポートを行う。

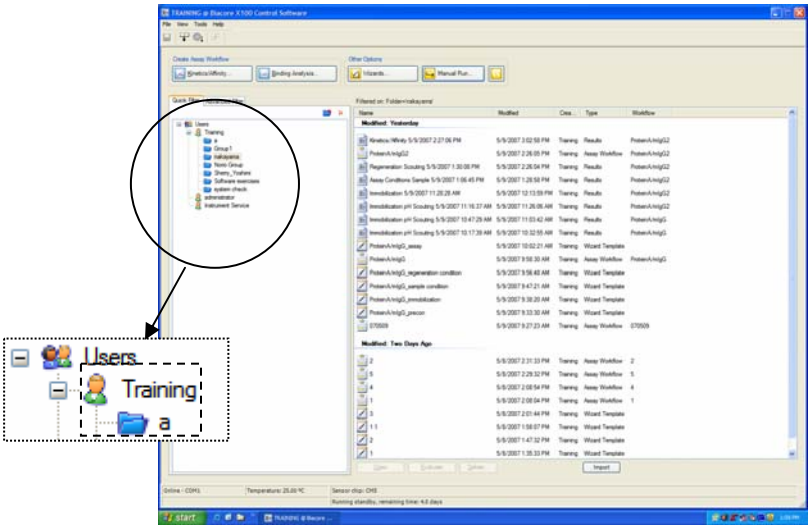
Restore・・・

指定したバックアップで、データベースの修復を行える。測定中に実施しないことを推奨する。
プルダウンメニューからバックアップを選択して、Restore をクリックする。確認画面の OK をクリックすると開始する。

注）

修復を実行すると全データはバックアップに置換する。
修復中は、データベースにアクセスできない。
最終バックアップ以降に保存したデータおよびユーザーネームとパスワードは、修復時に削除される。必要に応じ、データは別途 C:ドライブに保存を行う。
測定中に修復を実行した場合、測定データは一時的に C:ドライブに保存される。測定終了後、ソフトウェアの再起動行う。一時保存したデータをデータベースにインポートするための確認画面が表示される。画面に従いインポートを実施する。

参考；データの保存先



各“Users”は 1 階層のみフォルダーを作成できる。他ユーザーには作成できない（Administrator、Users 共通）。実験別にフォルダーを作成することをお勧めする。

参考；データの”export”および”import”

下表参照。

フォルダー / 権限	Administrators		Users	
	export	import	export	import
Administrators	○	○	○	○
Users	○*	○	○	○

＊Users が import したデータは削除可能。

索引

A

Add Report point 21
Administrators 159, 161, 162, 164
Affinity 24, 66, 85, 86, 87, 88
Aim for immobilized level 38, 40, 41, 111

B

Bar Chart 135
baseline 20, 152
Baseline 21, 51, 60, 121, 130, 150
Biacore Templates 65
binding 20, 40
Binding Analysis 88, 98, 132
Bivalent Analyte 75
Blank immobilization 41, 111
Bulk Effect VII

C

Calibration Curve 90, 95
Chi^2 79
Close 6, 8, 36, 39, 61, 110, 131, 139, 141
Concentration Analysis 88
Contact time 16, 47, 58, 67, 89, 117, 128
Copy Graph 156
crude VII
Current Fits 81
Custom Methods 42, 112
Custom Report Points 96
Cycle Purpose 69

D

Desorb 139
Desorb and Sanitize 140, 142
DMSO ..... V, VIII
Dock Chip 5, 137, 145

E

EDC ..... IV, 35, 38, 109
End manual run 52, 122
Evaluation explorer 150, 151
Evaluation Explorer 78, 87, 97, 135, 150, 157
Export 157

F

Flow path 13, 44, 52, 67, 68, 114, 122
Flow rate 13

G

Gridlines 155

H

Heterogeneous Analyte 75
Heterogeneous Ligand 75
Immobilization pH Scouting ..... VI, 32, 106
Immobilize 25, 26, 34, 36, 37, 39, 99, 100, 108, 110
Injection command 16, 18, 19, 47, 48, 117, 118

K
ka ..... III, IX, X, 77, 78, 80
kd ..... III, IX, X, 77, 78, 80
KD ..... III, VII, IX, X, XI
Keyword Table 72, 94
Kinetics 24, 66, 74, 87, 88
Kinetics/Affinity 62

L
Legend 155
Load Samples 10, 14, 18, 48, 118

M
Manual Run 13, 14, 44, 114

N
NHS ..... II, IV, V, 32, 35, 38, 106, 109

O
Oracle Database 145, 146, 147, 162
Other options 41, 44, 88, 111, 114
Overview 27, 33, 36, 39, 56, 61, 88, 101, 107, 110, 126, 131

P
Password 159, 160, 161
Preferences 159, 162
Prime 8, 54, 57, 66, 89, 124, 127, 137, 142, 145
Print 23

Q
Quality Control 76
Quick Filter 3, 4

R
Rack Ejected 10
Rack Illumination 10
rack locked 10, 14
Rack Positions 29, 34, 37, 54, 59, 64, 70, 91, 103, 108, 124, 129, 133
Reference line 21
Reference Line 21, 50, 120
Reference subtraction 13, 44, 66, 114
Regeneration Command 50, 120
RelResp 20, 150
Report point 21, 68, 152
Req X
Residuals 77, 78, 79
Result To Excel 157
Results reference 27, 33, 36, 39, 101, 107, 110
Reuse chip 5, 6
RI 77, 79, 82
Rmax ..... III, X, 77, 80, 82

S
Scale 154
SE 79
sensor chip 5, 6
Sensor Chip Maintenance 136, 137, 144
Sensorgram window 151, 152, 153, 154, 156, 157
Set Temperature 9

Single cycle kinetics 66
Specify contact time 41, 111
stability 20, 95, 96, 150
Standard error 79
Standby 6, 8, 17, 22, 30, 35, 38, 42, 46, 52, 56, 60, 64, 70, 92, 93, 104, 109, 112, 116, 122, 126, 130, 134, 137, 139, 141, 144
Stop Database 145, 146, 147
Stop Run 22, 30, 52, 92, 104, 122

T

temperature 1, 9
Two state Reaction (conformation change) 75
Undock 6, 137, 144, 145
Username 159
Users 14, 159, 161, 164
U-value 79

V

Vial/well position 16, 47, 117

W

Wizards 111
Work area 150, 151
Workflow 24, 26, 98, 100

あ

アナライト ..... II, III, VII, VIII, IX, X, XI, 77, 79, 80
アナライト 47, 72, 94, 117
アフィニティー ..... IX, X, XI
アミンカップリングキット IV
アミンカップリング法 ..... II, IV

い

イベントログ 19, 23

う

ウィザード VI
ウィザード 4, 25, 28, 53, 65, 68, 88, 92, 99, 101, 102, 123, 149

お

温度設定 9

か

カーブフィッティング ..... X, 81
解析結果 ..... VII, XI, 76, 77, 79, 81, 82
カイネティクス ..... IX, X, XI
カイネティクス解析 71
解離速度定数 ..... IX, 78
解離定数 ..... III, VII, IX, X, XI, 24, 78, 86

き

緊急停止 29, 30, 35, 38, 42, 55, 59, 64, 70, 92, 103, 104, 109, 112, 125, 129, 134

く

クルード VII

け
結合速度定数 ..... IX, 78
検量線 III

こ
固定化 .... I, II, III, IV, V, VI, VII, XII, 6, 7, 13, 25, 28, 31, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 43, 70, 88, 99, 102, 105, 106, 108, 109, 110, 111, 113, 136, 148
固定化量 ..... III, 32, 106

さ
再解析 79, 80, 81, 82
再生 ..... VII, VIII, IX, 79, 80, 82
再生溶液 ..... VIII, 17, 46, 50, 51, 58, 59, 61, 67, 89, 90, 116, 120, 121, 128, 129, 131
最大結合量 ..... III, 80

し
システムチェック 142
シングルサイクル法 ..... IX , 65, 71

す
スクリーニング ..... III, VII
ステータスマーク 76
スペック 77

せ
センサーチップの交換 137
センサーチップの固定化履歴 6
センサーチップの種類 3, 5, 7, 88
センサーチップの挿入 5

の
濃度測定 ..... III, 88

は
バイアル ..... IV, 10, 16, 18, 35, 38, 47, 48, 109, 117, 118, 139, 143
反応速度定数 ..... III, VII, IX, X
反応モデル 75, 79, 81

ひ
非線形最小二乗法 X
非特異的吸着 ..... VI, VII
標準誤差 79

ふ
フィッティング 77, 79, 80
フィッティング結果の評価 79

へ
平衡値解析 ..... X, 84

ほ
ポンプキャリブレーション 142

ま

マニュアル測定 44, 114
マルチサイクル法 IX

ゆ

有機溶媒 ..... V, VIII
ユーザー管理 159

よ

溶液効果 ..... VII, 77, 78, 87

ら

ラックの取り出し 10, 14, 17, 46, 116
ランニング緩衝液による平衡化 8
ランニング緩衝液の交換 8

り

リガンド ..... II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, 79, 80, 82
リガンド希釈液 ..... V, VI, 28, 32, 102, 106
リガンド希釈液の pH 選択 VI
リファレンスセル ..... VII, 77
流速 ..... XI, 35, 38, 109

れ

連続添加 IX

わ

ワークフロー ... 4, 11, 12, 24, 25, 26, 28, 33, 34, 36, 37, 39, 41, 44, 53, 56, 61, 62, 63, 65, 88, 98, 99, 100, 102, 107, 108, 110, 111, 114, 123, 126, 131, 132

安全上のご注意

必ずお守りください

このしおりには、弊社機器に関する一般的な注意事項を記載しています。取扱いの詳細は必ず製品添付の使用説明書をご覧ください。

誤った取扱いをした場合に生じる危険や損害の程度を、次の区分で説明しています。

警告　誤った取扱いをした場合に、死亡や重傷を負う可能性があるもの。

注意　誤った取扱いをした場合に、傷害または物的損害が発生する可能性があるもの。

図記号の意味は次の通りです。

禁止　⃠は、してはいけない「禁止」を示します。

❗は、必ず実行していただく「強制」を示します。

警告

禁止

電源プラグの抜き差しにより、運転を停止しない

火災・感電の原因になります。

禁止

電源コードを途中で接続しない、タコ足配線をしない

火災・感電・故障の原因になります。

禁止

電源コード・電源プラグを傷つけない

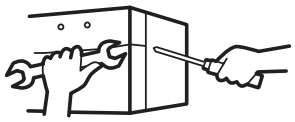
●加工しない　●束ねない　●ねじらない
●折らない　●物をのせない　●加熱しない
●無理に曲げない

破損して火災・感電の原因になります。

禁止

修理・分解・改造はしない

火災・感電の原因になります。



根元まで差込む

電源プラグのほこりを取り除き、刃の根元まで確実に差込む

接続が不十分だと、隙間にほこりが付着して火災・感電の原因になります。

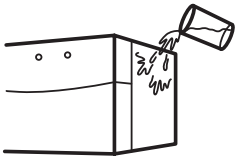
指定の規格

取扱説明書に指定された規格のコンセントを使用する

指定された規格以外で使用すると火災・感電の原因になります。

禁止

本体を水につけたり、水をかけたりしない



ショート・感電の原因になります。

禁止

電源コードや電源プラグが傷んだり、コンセントの差し込みがゆるいときは使わない

感電・ショート・発火の原因になります。

禁止

使用時や使用直後（運転停止後約60分間）は、操作に関係のない部位には触れない

高温部に触れ、やけどの原因になります。

プラグを抜く

異常時は、運転を停止して電源プラグを抜く

異常のまま運転を続けると火災・感電の原因になります。

禁止

同梱の電源コード・電源プラグ以外のコード・プラグを使用しない

故障・火災・感電の原因になります。

禁止

同梱の電源コード・電源プラグを他の電気機器に使用しない

故障・火災・感電の原因になります。

⚠ 注意

禁 止

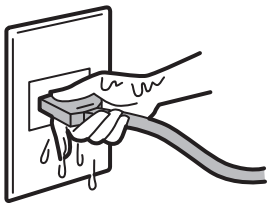
設置時は、次のような場所には置かない

●不安定な場所　●湿気やほこりの多い場所
●油煙や湯気が当たる場所
●直射日光の当たる場所　●風雨のあたる場所
●熱器具の近く　●高温になる場所
●吸・排気口をふさぐような場所

このような場所に置くと、ショートや発熱、電源コードの被膜が溶けるなどして、火災や感電、故障、変形の原因になることがあります。

禁 止

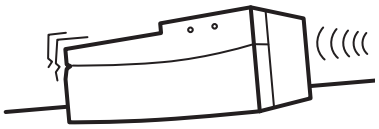
ぬれた手で電源プラグを抜き差しをしない



感電の原因になります。

水平

水平で丈夫な場所に設置する



プラグを持つ

電源プラグを持ってまっすぐ引き抜く

ななめに引き抜いたり、コードを持って抜くと、プラグの刃や芯線が破損してショート・感電・発火の原因になります。

⚠ 低温室で使用する場合の注意

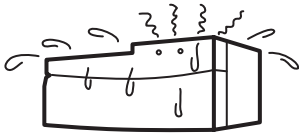
電源を
入れておく

装置を低温環境下でご使用になる場合、システム電源は常時入れておく

低温環境下で長時間システムの電源を落とした状態で放置すると、結露などにより故障の原因になります。
ランプなどの消耗品は OFF にしておくと、劣化を防ぐことができます。

電源を
入れない

装置を低温室から常温の場所に移動させる場合、常温に設置後、装置内の結露が無くなるまでシステム電源を入れない（状況により異なるが、通常半日から一昼夜）



感電・漏電火災の原因になります。

弊社製品についてのお問合せ　（バイオダイレクトライン）

TEL：03-5331-9336

受付時間 9：00 ～ 17：30
土・日・祝日、弊社指定休業日、年末年始を除く

www.gelifesciences.co.jp

e-mailで最新情報をお届けしています。お申込みは上記Webサイト右上の「メール会員登録」から。

© 2009 GE ヘルスケア バイオサイエンス株式会社　本書の全部または一部を無断で複写複製することは、著作権法上の例外を除き、禁じられています。
掲載されている製品は試験研究用以外には使用しないでください。掲載されている内容は予告なく変更される場合がありますのであらかじめご了承ください。
掲載されている社名や製品名は、各社の商標または登録商標です。

GEヘルスケア バイオサイエンス株式会社

本 社　〒169-0073
東京都新宿区百人町3-25-1 サンケンビルヂング

お問合せ：バイオダイレクトライン
TEL : 03-5331-9336　FAX : 03-5331-9370
e-mail : Tech-JP@ge.com

ISO 9001:2000認証取得

取扱店